

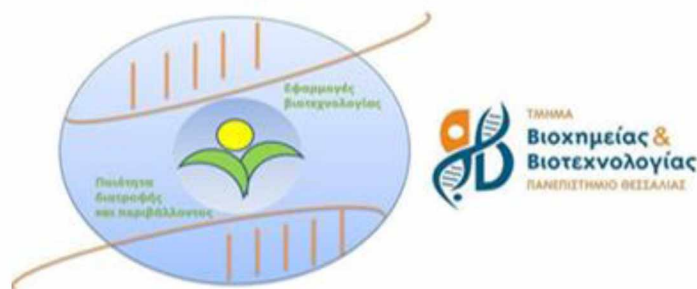
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Βιοτεχνολογία- Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«Ανάπτυξη υλικών αναφοράς αλκαλικής φωσφατάσης γάλακτος για
αγελαδινό και άλλα είδη γάλακτος.»

Δήμητρα Α. Χειμώνα
Πτυχιούχος Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου
Περιβάλλοντος
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2022



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ & ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

Πρόγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών
«Βιοτεχνολογία- Ποιότητα Διατροφής και Περιβάλλοντος»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
«Ανάπτυξη υλικών αναφοράς αλκαλικής φωσφατάσης γάλακτος για
αγελαδινό και άλλα είδη γάλακτος.»

«Development of milk alkaline phosphatase reference materials for cow
and other milk products.»

Δήμητρα Α. Χειμώνα

Πτυχιούχος Τμήματος Γεωπονίας, Ιχθυολογίας και Υδάτινου
Περιβάλλοντος

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

ΛΑΡΙΣΑ, 2022

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. **Μανούρας Αθανάσιος:** Καθηγητής, Τμήμα Διαιτολογίας και Διατροφολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **επιβλέπων**
2. **Μαλισσιόβα Ελένη:** Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Επιστήμης Ζωικής Παραγωγής, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **μέλος**
3. **Γιαννούλη Περσεφόνη:** Επίκουρη Καθηγήτρια, Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, **μέλος**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Παραδοσιακά οι άνθρωποι καταναλώνουν γάλα και γαλακτοκομικά προϊόντα ως μέρος μιας ισορροπημένης διατροφής με στόχο την πρόσληψη ενός ευρέως φάσματος θρεπτικών ουσιών. Προκειμένου το νωπό γάλα όλων των ειδών να καταναλωθεί με ασφάλεια, απαιτείται η παστερίωση του. Η παστερίωση είναι μια ήπια θερμική επεξεργασία τροφίμων όπου τα προϊόντα θερμαίνονται συνήθως κάτω από τους 100° C. Οι συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου για την κατάλληλη παστερίωση του γάλακτος καθορίζονται από τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό EC 2074/2005. Οι τυπικές πρακτικές για την αξιολόγηση της παστερίωσης του γάλακτος βασίζονται κυρίως στη θερμική αδρανοποίηση της κινητικής ενός ενδογενούς ενζύμου του γάλακτος, της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). Η δοκιμή της ALP αποτελεί μια γρήγορη δοκιμή ελέγχου της επιτυχούς παστερίωσης, που αρχικά σχεδιάστηκε και εφαρμόστηκε για την παστερίωση του αγελαδινού γάλακτος που καταναλώνεται κυρίως ως πόσιμο γάλα. Όμως, η γρήγορη αυτή δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης χρησιμοποιείται για τον έλεγχο της παστερίωσης και σε μη αγελαδινά γάλατα, χωρίς να υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την καταλληλότητα της.

Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο την ανάπτυξη υλικών αναφοράς αλκαλικής φωσφατάσης γάλακτος σε μη παστεριωμένα είδη γάλακτος (αγελαδινό, γίδινο, πρόβειο, βουβαλίσιο, ονόγαλα και γάλα καμήλας), προκειμένου να ισχυροποιηθεί η πραγματική αξία της δοκιμής της αλκαλικής φωσφατάσης για τον έλεγχο της παστερίωσης του γάλακτος. Η επεξεργασία των δειγμάτων για τον καθαρισμό της αλκαλικής φωσφατάσης πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια και περιλάμβανε την εκχύλιση κρέμας, την επεξεργασία με n-βουτανόλη και την καθίζηση ακετόνης.

Τα αποτελέσματα για τη δραστηριότητα της ALP είναι 3,968(Abs) για το αγελαδινό, 3,917(Abs) για το βουβαλίσιο, 1,974(Abs) για το γίδινο, 7,134(Abs) για το πρόβειο, 1,327(Abs) για το γάλα καμήλας και 2,564(Abs) για το ονόγαλα. Οι τιμές για τη συγκέντρωση της ολικής ALP για το αγελαδινό, βουβαλίσιο, γίδινο, πρόβειο, γάλα καμήλας και το ονόγαλα είναι 709,46(mg/ml), 441,08(mg/ml), 711,99(mg/ml), 522,29(mg/ml), 612,8(mg/ml) και 660,9(mg/ml), αντίστοιχα.

Λέξεις- κλειδιά: αλκαλική φωσφατάση, παστερίωση, αγελαδινό γάλα, πρόβειο γάλα, αίγιο γάλα, βουβαλίσιο γάλα, ονόγαλα, γάλα καμήλας, δραστηριότητα ALP

ABSTRACT

Traditionally humans consume milk and dairy products as part of a balanced diet, aiming to acquire a wide range of nutritional substances. In order to be consumed the raw milk of all kinds safely, pasteurization is required. Pasteurization is a gentle heat treatment of food where the products are typically heated below 100° C. The temperature and time conditions for the proper pasteurization of milk are determined by European Regulation EC 2074/2005. Typical practices for evaluating milk pasteurization are based primarily on the thermal inactivation of the kinetics of an endogenous milk enzyme, alkaline phosphatase (ALP). The ALP test is a rapid test of successful pasteurization, originally designed and implemented for cow's milk pasteurization which consumed primarily as drinking milk. However, this rapid alkaline phosphatase test is used to control pasteurization in non-cow milk as well, without sufficient data on its suitability.

The present study aims to develop milk alkaline phosphatase standard materials for different types of milk (cow, goat, sheep, buffalo, donkey and camel milk), in order to strengthen the real value of the alkaline phosphatase test to control milk pasteurization. The treatment of alkaline phosphatase purification samples was performed in three steps and included cream extraction, n-butanol treatment and acetone precipitation.

The results for ALP activity are 3,968 (Abs) for cow, 3,917 (Abs) for buffalo, 1,974 (Abs) for goat, 7,134 (Abs) for sheep, 1,327 (Abs) for camel milk and 2,564 (Abs) for donkey milk. The values for the concentration of total ALP for cow, buffalo, goat, sheep, camel milk and donkey milk are 709.46 (mg / ml), 441.08 (mg / ml), 711.99 (mg / ml), 522.29 (mg / ml), 612.8 (mg / ml) and 660.9 (mg / ml), respectively.

Keywords: alkaline phosphatase, pasteurization, cow's milk, sheep's milk, goat's milk, buffalo milk, donkey milk, camel milk, ALP activity

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ABSTRACT

1. Εισαγωγή	
1.1 Ορισμός γάλακτος.....	7
1.2 Παγκόσμια παραγωγή γάλακτος.....	7
1.3 Χημική σύσταση γάλακτος.....	8
1.4 Θερμική επεξεργασία γάλακτος.....	11
1.5 Αλκαλική φωσφατάση (ALP) γάλακτος.....	17
1.5.1 Δραστηριότητα ALP σε μη αγελαδινό γάλα.....	18
1.5.2 Επίδραση λίπους στην ALP.....	20
1.5.3 Θερμική αδρανοποίηση ALP.....	21
1.5.4 Όρια ALP σε μη αγελαδινό παστεριωμένο γάλα.....	24
1.5.5 Επανενεργοποίηση ALP.....	25
1.6 Μέθοδοι προσδιορισμού ALP.....	27
1.6.1 Χρωματομετρικές τεχνικές.....	28
1.6.2 Φθορισμομετρικές τεχνικές.....	30
1.6.3 Τεχνικές Χημειοφωταύγειας.....	31
1.6.4 Ανοσοχημικές τεχνικές.....	32
1.7 Εφαρμογές και περιορισμοί των μεθόδων προσδιορισμού ALP.....	33
1.8 Σκοπός εργασίας.....	35
2. Υλικά και μέθοδοι	
2.1 Δειγματοληψία.....	36
2.2 Αντιδραστήρια αναλύσεων.....	36
2.3 Επεξεργασία δειγμάτων.....	37
2.4 Δοκιμασία δραστικότητας ALP.....	38
2.5 Εκτίμηση ολικής ALP.....	40
3. Αποτελέσματα- Συζήτηση	41
4. Συμπεράσματα	48
5. Βιβλιογραφία	49

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ορισμός γάλακτος

Σύμφωνα με τον ελληνικό Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (2003), γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν της ολοσχερούς χωρίς διακοπή άμελης υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δεν βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης. Η νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης (ΕΕ) ορίζει ως «νωπό γάλα», το γάλα που παράγεται από την έκκριση του μαστικού αδένος εκτρεφόμενων ζώων που δεν έχει θερμανθεί σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των 40 °C ή δεν έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με ισοδύναμο αποτέλεσμα (Κανονισμός (ΕΚ) αριθ. 853/2004). Το γάλα όλων των θηλαστικών προορίζεται από τη φύση του να αποτελέσει τη μοναδική τροφή των νεογνών τους στα πρώτα στάδια της ζωής τους. Κάθε θηλαστικό παράγει γάλα με χημική σύσταση προσαρμοσμένη στις διατροφικές ανάγκες του νεογνού του. Επομένως, το γάλα αποτελεί την πιο πλήρη φυσική τροφή, καθώς περιέχει συστατικά που εφοδιάζουν τον οργανισμό με ενέργεια (λίπος, λακτόζη), με δομικά συστατικά (πρωτεΐνες, ανόργανα άλατα) αλλά και με επαρκείς ποσότητες βιταμινών και ιχνοστοιχείων απαραίτητες για τη ζωή. Ενώ, το γάλα κάθε θηλαστικού αποτελεί τροφή μόνο για τα νεογνά του, ο άνθρωπος χρησιμοποιεί το γάλα και των άλλων θηλαστικών σε όλες τις ηλικίες του.

1.2 Παγκόσμια παράγωγή γάλακτος

Το αγελαδινό γάλα είναι ο πιο κοινός τύπος γάλακτος που κυριαρχεί στην παγκόσμια παραγωγή. Ωστόσο, σε ορισμένα μέρη του κόσμου παράγεται γάλα και από άλλα είδη ζώων, με επίσης σημαντικό μερίδιο στην κατανάλωση γάλακτος. Το αγελαδινό γάλα αντιπροσωπεύει το 85% του γάλακτος που παράγεται παγκοσμίως, η παραγωγή βουβαλίσσιου γάλακτος κατέχει ένα ποσοστό 11%, ακολουθούμενη από το αίγαιο με 2,3%, το πρόβειο με 1,4% και το γάλα καμήλας με 0,2% (Gerosa & Skoet, 2012). Για άλλα είδη ζώων, όπως άλογα και γαϊδούρια, δεν υπάρχουν διαθέσιμες παγκόσμιες στατιστικές, αλλά η συμβολή τους στην παγκόσμια παραγωγή γάλακτος είναι μικρότερη από 0,1% (Faye B., & Konuspayeva G., 2012).

1.3 Χημική σύσταση γάλακτος

Το γάλα και τα προϊόντα του είναι τρόφιμα υψηλής διατροφικής πυκνότητας που παρέχουν μεγάλη ποσότητα θρεπτικών συστατικών σε σχέση με το ενεργειακό τους περιεχόμενο, το οποίο εξαρτάται από τη λιποπεριεκτικότητα τους και τα διάφορα πρόσθετα. Η σύνθεση του γάλακτος μπορεί ωστόσο, να διαφέρει σε μεγάλο βαθμό, όχι μόνο μεταξύ μηρυκαστικών και μη μηρυκαστικών, αλλά και μεταξύ του ίδιου είδους και μεταξύ των μεμονωμένων ζώων. Επιπλέον, οι διαφορές στη σύνθεση του γάλακτος δεν αφορούν μόνο τις σχετικές αναλογίες των συστατικών του γάλακτος, αλλά επίσης συμβαίνουν και σε μοριακό επίπεδο (π.χ. μονομερείς έναντι διμερών πρωτεϊνών, διαφορετική αλληλουχία αμινοξέων, κ.α.(Claeys et al., 2014).

Το γάλα μπορεί να περιγραφεί ως ένα κολλοειδές εναιώρημα που περιέχει γαλακτωματοποιημένα σφαιρίδια λίπους, μια ετερογενή ομάδα πρωτεϊνών, τον υδατάνθρακα λακτόζη, άλατα, βιταμίνες και ένζυμα. Τα γάλατα των θηλαστικών που έχουν μελετηθεί μέχρι σήμερα, έχουν παρόμοια γενικά χαρακτηριστικά και περιέχουν μια μεγάλη ποικιλία όμοιων συστατικών, σε σημαντικά διαφορετικές αναλογίες.

Γενικά, το γάλα των μηρυκαστικών έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λακτόζη, αλλά υψηλότερη πρωτεΐνη (και καζεΐνη), λίπος με υψηλότερο ποσοστό κορεσμένων και μονοακόρεστων λιπαρών οξέων και υψηλότερο επίπεδο χοληστερόλης, βιταμίνες (εκτός από τη βιταμίνη C) και περιεκτικότητα σε μέταλλα, σε σύγκριση με το γάλα του αλόγου ή του γαϊδουριού (Claeys et al.,2014). Η βασική σύνθεση του κατσικίσιου γάλακτος είναι σχεδόν παρόμοια με αυτή του αγελαδινού γάλακτος. Ενώ το αγελαδινό γάλα είναι αρκετά σταθερό σε σύσταση, το αιγοπρόβειο γάλα παρουσιάζει μεγαλύτερες διακυμάνσεις λόγω των διακυμάνσεων στις συνθήκες διατροφής, των περιβαλλοντικών συνθηκών, της εποχής και του σταδίου γαλουχίας και λόγω διαφορών στη φυλή (EFSA, 2021).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, το κατσικίσιο γάλα έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε ξηρή ουσία ως αποτέλεσμα υψηλότερου επιπέδου πρωτεΐνης (έως και περισσότερο από 5%) ή/και περιεκτικότητας σε λίπος (έως και περισσότερο από 7%). Τα ολικά στερεά στο πρόβειο γάλα είναι υψηλότερα έως και 20%, λόγω των υψηλών επιπέδων σε λιπαρά έως 9% και της πρωτεΐνης έως 7% (EFSA, 2021, Claeys et al.,2014). Επίσης, το βουβαλίσιο γάλα έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε ξηρή ουσία από αυτή του αγελαδινού γάλακτος, και οφείλεται κυρίως στην υψηλότερη περιεκτικότητα σε

καζεΐνη και λιπαρά. Το γάλα ιπποειδών και της γαϊδούρας έχει χαμηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη με λιγότερη καζεΐνη. Η περιεκτικότητα σε λιπαρά αυτών των ειδών γάλακτος είναι επίσης χαμηλότερη από αυτή του γάλακτος των μηρυκαστικών, ενώ η περιεκτικότητα σε λακτόζη είναι ελαφρώς υψηλότερη. Η συνολική περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος των διαφόρων ειδών είναι παρόμοια. Επιπλέον, η β-λακτοσφαιρίνη (β-Lg) είναι η πιο άφθονη πρωτεΐνη ορού γάλακτος των καμηλών (EFSA,2021, Claeys et al.,2014).

Γενικά, γίνεται μια διάκριση μεταξύ «καζεϊνούχου» γάλακτος (δηλαδή γάλα μηρυκαστικών που είναι σχετικά πλούσιο σε καζεΐνη) και «αλβουμινούχου» γάλακτος (δηλαδή γάλα μη μηρυκαστικών που έχει αναλογικά υψηλότερη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνη ορού γάλακτος αναλογία καζεΐνης / ορού γάλακτος). Το κλάσμα της καζεΐνης αντιπροσωπεύει περίπου το 80% των πρωτεϊνών του αγελαδινού και πρόβειου γάλακτος, περίπου το 50% των πρωτεϊνών του γάλακτος του αλόγου και λιγότερες από το 50% τις πρωτεΐνες του μητρικού γάλακτος (Malacarne, Martuzzi, Summer, & Mariani, 2002, Park, Juárez, Ramos, & Haenlein, 2007, Poto cnik, Gantner, Kuterovac, & Cividini, 2011).

Η περιεκτικότητα σε λιπαρά στο ονόγαλα και στο γάλα αλόγου είναι πολύ χαμηλότερη από την περιεκτικότητα σε λιπαρά στο ανθρώπινο και στο γάλα των μηρυκαστικών, που επίσης αντανακλάται από τη θερμιδική τους αξία. Το λίπος του γάλακτος των αλόγων και των γαϊδουριών αποτελεί το 80 με 85% των τριγλυκεριδίων, για το 9,5% των ελεύθερων λιπαρών οξέων και το 5 με 10% των φωσφολιπιδίων. Το λίπος του αγελαδινού, του αιγοπρόβειου και του ανθρώπινου γάλακτος αποτελεί το 97 με 98% των τριγλυκεριδίων, αλλά έχουν χαμηλά επίπεδα φωσφολιπιδίων (0,5 με 1,5%) και ελεύθερα λιπαρά οξέα (0,7 με 1,5%) (Doreau & Martin-Rosset,2002, Jensen, Ferris, Lammi-Keefe, & Henderson, 1990, Malacarne et al., 2002, Park et al., 2007, Uniacke-Lowe, 2011). Σε σύγκριση με τα μηρυκαστικά, το λίπος γάλακτος του αλόγου και του γαϊδουριού περιέχει υψηλότερο ποσοστό πολυακόρεστων λιπαρών οξέων (PUFA) και ένα χαμηλότερο ποσοστό κορεσμένων λιπαρών οξέων (SFA) και μονοακόρεστα λιπαρά οξέα (MUFA). Τα λιπαρά οξέα στο γάλα αλόγου και στο ονόγαλα είναι κυρίως ακόρεστα ή μικρής αλυσίδας, που έχουν ενδιαφέρον από διατροφική άποψη (Salamon, Salamon, Csapó-Kiss, & Csapó, 2009, Gastaldi et al.,2010). Το γάλα των περισσότερων από τα εξεταζόμενα μηρυκαστικά περιέχει παρόμοιο επίπεδο χοληστερόλης, όπως το ανθρώπινο γάλα, ενώ το επίπεδο

της χοληστερόλης στο γάλα του αλόγου και του γαϊδουριού φαίνεται πολύ χαμηλότερο (Dietschy and Turley,2004, Gidding et al.,2006).

Η λακτόζη είναι ποσοτικά ο κύριος υδατάνθρακας του γάλακτος. Η συγκέντρωσή της, είναι παρόμοια στο γάλα αλόγου, στο ονόγαλα και στο ανθρώπινο γάλα, αλλά χαμηλότερη στο αγελαδινό ή σε άλλο γάλα μηρυκαστικών (Kunz & Rudloff, 2006). Η συνολική περιεκτικότητα σε βιταμίνες του γάλακτος είναι πολύ μεταβλητή και εξαρτάται από την κατάσταση της βιταμίνης και το καθεστώς διατροφής, με το επίπεδο των υδατοδιαλυτών βιταμινών να επηρεάζεται περισσότερο από την τροφή σε σχέση με το επίπεδο των λιποδιαλυτών βιταμινών (Claeys et al.,2014). Η περιεκτικότητα σε βιταμίνες για το γάλα του αλόγου και του γαϊδουριού είναι κατά μέσο όρο χαμηλότερη από την περιεκτικότητα των βιταμινών στο γάλα των μηρυκαστικών (Claeys et al.,2014) . Το γάλα καμήλας επίσης, έχει υψηλή περιεκτικότητα σε βιταμίνη C και μπορεί να περιέχει τρεις φορές περισσότερη βιταμίνη C από το αγελαδινό γάλα (Farah, Rettenmaier, & Atkins,1992). Επιπλέον, σημειώνεται ότι το γάλα των αιγοπροβάτων και του βουβαλιού έχει υψηλότερη περιεκτικότητα σε βιταμίνη A από το αγελαδινό γάλα. Το γάλα τους είναι πιο λευκό από τα άλλα γάλατα λόγω της ικανότητας να μετατρέπουν το κίτρινο β-καροτένιο σε βιταμίνη A (Abd El-Salam& El-Shibiny,2011, Jainudeen, 2002, Park et al.,2007).

Συνοπτικά, το γάλα των μηρυκαστικών περιέχει υψηλότερη πρωτεΐνη («γάλα καζεΐνης») και περιεκτικότητα σε λιπαρά (με περισσότερα κορεσμένα λιπαρά οξέα και MUFAs, αλλά λιγότερα PUFAs) σε σύγκριση με το γάλα των μη μηρυκαστικών («γάλα αλβουμίνης»). Το περιεχόμενο σε μέταλλα και βιταμίνες είναι επίσης υψηλότερο στο γάλα των μηρυκαστικών ζώων (Claeys et al.,2014).

Πίνακας 1. Ολική σύνθεση γάλακτος διαφόρων θηλαστικών

	Άνθρωπος	Άλογο	Όνος	Αγελάδα	Πρόβατο	Αίγα	Βουβάλι	Καμήλα
Ολικά στερεά (g/l)	107-129	93-116	88-117	118-130	181-200	119-163	157-172	119-150
Πρωτεΐνες (g/l)	9-19	14-32	14-20	30-39	45-70	30-52	27-47	24-42
Καζεΐνη/ορός γάλακτος	0,4-0,5	1,1	1,28	4,7	3,1	3,5	4,6	2,7-3,2
Λίπος (g/l)	21-40	3,42	3-18	33-54	50-90	30-72	53-90	20-60
Λακτόζη (g/l)	63-70	56-72	58-74	44-56	41-59	32-50	32-49	35-51
Τέφρα (g/l)	2-3	3-5	3-5	7-8	8-10	7-9	8-9	6,9-9
Ενέργεια (KJ/l)	2843	1993	1705	2709-2843	4038-4439	2802-2894	4244-4779	2848

Με βάση τις ελάχιστες και μέγιστες τιμές που υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Για κάποιες αναφορές δεν υπάρχουν περιγραφές σχετικά με τις περιόδους μετά τον τοκετό ή τα στάδια γαλουχίας. Πηγές: Arman, Kay, Goodall, & Sharman, 1974, Guo et al., 2007, Hassan et al., 2009, Malacarne et al., 2002, Medhammar et al., 2012, Mittaine, 1962, Naert et al., 2013, Park et al., 2007, Potocnik et al., 2011, Salimei & Fantuz, 2012, Shamsia, 2009, Souci, Fachmann, & Kraut, 2008, p. 1464, Uniacke-Lowe, 2011, chap. 1 & 2, Xi, Li, & Gao, 2010.

1.4 Θερμική επεξεργασία γάλακτος

Η κατανάλωση νωπού γάλακτος (Raw Drinking Milk, RDM) ενέχει ρεαλιστικό μικροβιολογικό κίνδυνο για τον καταναλωτή καθώς, το γάλα είναι πολύ πλούσιο σε θρεπτικά συστατικά και αυτό μπορεί να το οδηγήσει σε ένα ιδανικό περιβάλλον ανάπτυξης για πολλούς μικροοργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των παθογόνων. Οι κύριοι μικροβιολογικοί κίνδυνοι που σχετίζονται με το RDM από αγελάδες, πρόβατα και κατσίκες, γαϊδούρια και καμήλες προσδιορίστηκαν ως δυνητικά μεταδιδόμενοι μέσω του γάλακτος και υπάρχουν στον γαλακτοπαραγωγό ζωικό πληθυσμό της ΕΕ, περιλαμβάνουν τα βακτήρια *Campylobacter spp.* (θερμόφιλο), *Salmonella spp.*, *Escherichia coli* που παράγει τοξίνες, *Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium bovis*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Corynebacterium spp.*, *Streptococcus suis* subsp.. *zooepidemicus*, τα παράσιτα *Toxoplasma gondii* και *Cryptosporidium parvum* και ο ιός της εγκεφαλίτιδας (EFSA, 2015).

Προκειμένου το γάλα να καταναλωθεί με ασφάλεια υφίσταται διάφορες θερμικές επεξεργασίες. Οι θερμικές επεξεργασίες που εφαρμόζονται στο γάλα έχουν το διπλό σκοπό να καταστήσουν το προϊόν πιο υγιές και να επεκτείνουν τη διάρκεια ζωής του. Ωστόσο, κάποια τροποποίηση στο γάλα μπορεί αναπόφευκτα να συμβαίνει μετά από τη θερμική επεξεργασία, αλλά το θερμικά επεξεργασμένο γάλα είναι αναμφίβολα ο καλύτερος συμβιβασμός μεταξύ της ασφάλειας (βασική απαίτηση) και της θρεπτικής και οργανοληπτικής ποιότητας του γάλακτος. Οι συνθήκες θερμοκρασίας και χρόνου στις θερμικές επεξεργασίες του γάλακτος καθορίζονται σύμφωνα με τον Ευρωπαϊκό Κανονισμό (EC 2074/2005). Οι ευρέως χρησιμοποιούμενες θερμικές επεξεργασίες, κατά σειρά αυξανόμενης έντασης, είναι η θερμοποίηση, η παστερίωση, η υψηλή παστερίωση, η επεξεργασία παρατεταμένης διάρκειας ζωής (ESL), η επεξεργασία UHT (Ultra High Temperature) και η αποστείρωση σε περιέκτη (EFSA, 2021).

- **Θερμοποίηση**

Η θερμοποίηση ή υποπαστερίωση περιλαμβάνει τη θέρμανση του γάλακτος στους 57–68°C για 5–20 δευτερόλεπτα και χρησιμοποιείται για τη διατήρηση της ποιότητας του νωπού γάλακτος για κάποιο χρονικό διάστημα πριν υποβληθεί σε περαιτέρω επεξεργασία. Στόχος είναι η μείωση της ανάπτυξης ψυχρότροφων βακτηρίων, τα οποία μπορεί να απελευθερώσουν στο γάλα κάποια ένζυμα (πρωτεάσες και λιπάσες) ανθεκτικά στη θερμότητα, τα οποία αν δεν αδρανοποιηθούν πλήρως κατά τις επόμενες θερμικές επεξεργασίες, μπορεί να αλλοιώσουν το επεξεργασμένο γάλα ή τα μεταγενέστερα προϊόντα του γάλακτος όπως τυριά ή σκόνες γάλακτος ή μπορεί ακόμη να μειώσουν σημαντικά τη διάρκεια ζωής του γάλακτος UHT. Έπειτα, το γάλα που έχει υποστεί θερμοποίηση χρησιμοποιείται σε άλλα θερμικά επεξεργασμένα γάλατα ή μετατρέπεται σε διάφορα γαλακτοκομικά προϊόντα (Deeth and Lewis, 2017). Το θερμασμένο γάλα ξεχωρίζει από το παστεριωμένο γάλα γιατί είναι θετικό σε ALP.

- **Παστερίωση**

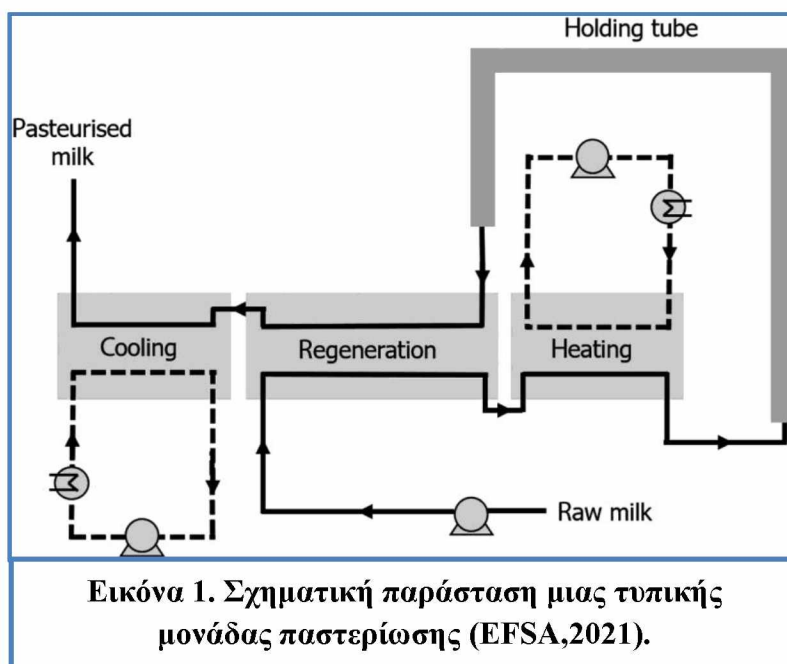
Σύμφωνα με τον κώδικα Codex (CAC, 2004) για το γάλα και τα γαλακτοκομικά προϊόντα, «παστερίωση είναι η εφαρμογή θερμότητας στο γάλα και τα υγρά γαλακτοκομικά προϊόντα με στόχο τη μείωση του αριθμού οποιωνδήποτε παθογόνων μικροοργανισμών σε ένα επίπεδο στο οποίο δεν αποτελούν κίνδυνο για την υγεία. Σύμφωνα με τους Bylund (1995) και Deeth (2006) η παστερίωση είναι μια ήπια θερμική επεξεργασία με μικρή επίδραση στις φυσικές, χημικές, θρεπτικές και οργανοληπτικές ιδιότητες του γάλακτος (Οι συνθήκες που χρησιμοποιούνται στην παστερίωση έχουν σχεδιαστεί για να αδρανοποιούν τα πιο ανθεκτικά στη θερμότητα, παθογόνα βακτήρια που δεν σχηματίζουν σπόρια στο γάλα, το *Mycobacterium tuberculosis* και το *Coxiella burnetii* αλλά να μειώνει και τα βακτήρια και τα ένζυμα που θα μπορούσαν να προκαλέσουν αλλοίωση του προϊόντος. Σύμφωνα με το CAC (2004), με την παστερίωση επιτυγχάνεται το λιγότερο μια μείωση της τάξης των 5 log του *C. burnetii* στο πλήρες γάλα, με αποτέλεσμα να υπάρχει πολύ σημαντική μείωση στους πληθυσμούς των παθογόνων βακτηρίων που μπορεί να υπάρχουν στο νωπό γάλα (Deeth and Lewis, 2017). Με την παστερίωση παρατείνεται η διάρκεια ζωής του γάλακτος. Για τη διασφάλιση μεγάλης διάρκειας ζωής στο παστεριωμένο γάλα, χρειάζεται ψύξη ακόμη και σε κλειστές συσκευασίες.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, οι συνθήκες παστερίωσης μπορούν να επιτευχθούν με:

- (i) υψηλή θερμοκρασία για μικρό χρονικό διάστημα (HTST), τουλάχιστον 72° C για 15 δευτερόλεπτα,
- (ii) χαμηλή θερμοκρασία για μεγάλο χρονικό διάστημα (LTLT), τουλάχιστον 63° C για 30 λεπτά ή
- (iii) οποιονδήποτε άλλο συνδυασμό θερμοκρασίας - χρόνου με την προϋπόθεση της επίτευξης ισοδύναμου αποτελέσματος.

Η παστερίωση πραγματοποιείται κυρίως με τη διαδικασία HTST όπου το γάλα θερμαίνεται στους 72–75°C με χρόνο παραμονής 15–20 s πριν την ψύξη. Για την διαδικασία της παστερίωσης χρησιμοποιούνται εναλλάκτες θερμότητας. Οι κύριοι τύποι εναλλακτών θερμότητας για το γάλα είναι ο πλακοειδής και ο σωληνωτός. Η διάταξη για μια τυπική μονάδα παστερίωσης αποτελείται από την

προθέρμανση του νοπού γάλακτος στο στάδιο της αναγέννησης, στη συνέχεια τη θέρμανση, τον σωλήνα συγκράτησης, την πρώτη ψύξη του παστεριωμένου γάλακτος στο στάδιο της αναγέννησης και στη συνέχεια το τελικό στάδιο ψύξης όπου το γάλα ψύχεται με κρύο νερό. Η διάρκεια ζωής για το παστεριωμένο γάλα ποικίλλει μεταξύ των χωρών, αλλά κυμαίνεται από 5 έως 21 ημέρες (Deeth and Lewis, 2017).



- **Υψηλή παστερίωση**

Η υψηλή παστερίωση πραγματοποιείται σε θερμοκρασίες μεταξύ 85 και 127°C για 1-4 δευτερόλεπτα (Töpel,2004), με διάφορες διακυμάνσεις στις συνθήκες θέρμανσης (Deeth and Lewis,2017). Στα γάλατα υψηλής παστερίωσης, αναμένονται αρνητικές τιμές για δραστικότητα ALP και LPO(EFSA,2021).

- **Επεξεργασία γάλακτος παρατεταμένης διάρκειας ζωής**

Το γάλα παρατεταμένης διάρκειας ζωής (Extended Shelf-Life,ESL) παράγεται με μία από τις δύο κύριες τεχνολογίες: 1) θερμική επεξεργασία με πιο αυστηρές συνθήκες από την παστερίωση αλλά λιγότερο αυστηρές από την επεξεργασία UHT και 2) με μη θερμικές διεργασίες όπως η μικροδιήθηση και η βακτοφυγοκέντρωση, που συνήθως συνδυάζονται με μια τελική επεξεργασία θερμικής παστερίωσης για την κάλυψη των νόμιμων απαιτήσεων (Deeth and Lewis,2017). Οι συνθήκες θερμοκρασίας- χρόνου για το γάλα ESL κυμαίνονται από 123–145°C για 1–5 sec. Το

γάλα ESL έχει μεγαλύτερη διάρκεια ζωής στο ψυγείο συγκριτικά με αυτή του παστεριωμένου γάλακτος (EFSA, 2021).

- **Αποστείρωση**

Μετά την επεξεργασία του γάλακτος (τυποποίηση λίπους, ομογενοποίηση και θέρμανση στους 80°C), το γάλα τοποθετείται σε μπουκάλια ή σε σφραγισμένα δοχεία και πραγματοποιείται η αποστείρωση συνήθως στους 115–120°C για 20–30 λεπτά. Επίσης, η αποστείρωση μπορεί να πραγματοποιηθεί και με συνεχή επεξεργασία σε εξαιρετικά υψηλή θερμοκρασία (Ultra High Temperature, UHT) ακολουθούμενη από ασηπτική συσκευασία. Τα αποστειρωμένα σε περιέκτες προϊόντα και τα UHT προϊόντα έχουν εκτεταμένη διάρκεια ζωής (EFSA, 2021). Το προϊόν, ακόμη ζεστό, μεταφέρεται σε αυτόκλειστα κατά την παραγωγή παρτίδας ή σε υδροστατικό πύργο συνεχούς παραγωγής, όπου πραγματοποιείται αποστείρωση στις συνθήκες χρόνου και θερμοκρασίας που αναφέρθηκαν παραπάνω (EFSA, 2021).

Η επεξεργασία UHT είναι μια συνεχής διαδικασία που πραγματοποιείται σε ένα κλειστό σύστημα με σκοπό την αποτροπή της μόλυνσης του προϊόντος από αερομεταφερόμενους μικροοργανισμούς. Οι συνθήκες θερμοκρασίας – χρόνου είναι 135–145°C για 2–5 δευτερόλεπτα. Με την UHT επεξεργασία επιτυγχάνεται η θανάτωση των μικροοργανισμών και αδρανοποιούνται σχεδόν όλα τα ένζυμα που θα μπορούσαν να μειώσουν τη διάρκεια ζωής των προϊόντων. Απαραίτητη προϋπόθεση είναι η άσηπτη πλήρωση για την αποφυγή επαναμόλυνσης του προϊόντος. Οι μέθοδοι επεξεργασίας UHT που χρησιμοποιούνται είναι: (i) Έμμεση θέρμανση και ψύξη σε εναλλάκτες θερμότητας, (ii) Άμεση θέρμανση με έγχυση ατμού ή έγχυση γάλακτος στον ατμό και ψύξη με διαστολή υπό κενό (Bylund, 1995 & Deeth and Lewis, 2017 & EFSA, 2021).

Οι συνθήκες επεξεργασίας UHT αλληλεπικαλύπτονται με εκείνες του υπερπαστεριωμένου γάλακτος που υποβάλλεται σε επεξεργασία σε θερμοκρασία τουλάχιστον 135°C για 2 δευτερόλεπτα. Η επεξεργασία UHT έχει ως στόχο την παραγωγή προϊόντων που δεν περιέχουν μικροοργανισμούς ικανούς να αναπτυχθούν υπό κανονικές συνθήκες αποθήκευσης. Οι μη συχνές βακτηριακές προσμείξεις σε γάλατα UHT προκύπτουν είτε από την επιβίωση ανθεκτικών στη θερμότητα σπορίων

είτε από μόλυνση μετά τη διαδικασία μέσω μόλυνσης του εξοπλισμού στο τμήμα μετά την αποστείρωση της μονάδας (Deeth and Lewis,2017).

- **Μη θερμικές τεχνολογίες**

Η ζήτηση των καταναλωτών για ελάχιστη επεξεργασία στα τρόφιμα με σκοπό τη διατήρηση της γεύσης και των θρεπτικών ιδιοτήτων όπως τα φρέσκα τρόφιμα έχει ωθήσει τις μη θερμικές τεχνολογίες. Παρακάτω περιγράφονται από τους Deeth και Lewis (2017) οι ακόλουθες μη θερμικές τεχνολογίες μόνες τους ή με κάποια πρόσθετη θερμική επεξεργασία για την παραγωγή γάλακτος και γαλακτοκομικών προϊόντων: μικροδιήθηση, επεξεργασία υψηλής πίεσης (HPP), τεχνολογία παλμικού ηλεκτρικού πεδίου, ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, βακτοφυγοκέντρωση, ακτινοβολία UV , γ-ακτινοβολία, διοξείδιο του άνθρακα και διοξείδιο του άνθρακα υψηλής πίεσης. Οι εφαρμογές HPP, η τεχνολογία παλμικού ηλεκτρικού πεδίου και η ομογενοποίηση υψηλής πίεσης, αναθεωρήθηκαν από τους Deeth et al.,(2013).

Οι περισσότερες από τις μεθόδους αναφοράς και επίσημης αξιολόγησης της θερμικής επεξεργασίας στο γάλα βασίζονται στην αξιολόγηση των τροποποιήσεων ορισμένων συστατικών του γάλακτος μετά τη θερμική επεξεργασία, όπως είναι ο προσδιορισμός των ενζυματικών ενεργειών της αλκαλικής φωσφατάσης και της λακτουπεροξειδάσης, οι πρωτεΐνες ορού γάλακτος, οι ενώσεις αντίδρασης Maillard (γενικά φουροσίνη και λακτουλόζη). Εάν οι δραστηριότητες της ALP μειώνονται σημαντικά, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι ο πληθυσμός του βακτηριακού παθογόνου-στόχου είχε τουλάχιστον παρόμοια μείωση και οι νόμιμες θερμικές απαιτήσεις για την παστερίωση είναι ικανοποιητικές. Επιπλέον, στο παστεριωμένο γάλα, το ενδογενές ένζυμο λακτουπεροξειδάση (LPO) πρέπει να είναι ακόμα ενεργό. Σε ορισμένες χώρες όπως η Ελβετία (Eberhard and Gallmann, 1994), το αρνητικό LPO στο γάλα αναφέρεται ως γάλα «υψηλά παστεριωμένο», αλλά αυτός δεν είναι ένας σαφώς καθορισμένος όρος στην ΕΕ.

1.5 Αλκαλική φωσφατάση (ALP)

Η αλκαλική φωσφατάση (Alkaline Phosphatase, ALP) είναι μια πρωτεΐνη που περιγράφηκε για πρώτη φορά από τον Suzuki (1907). Η αλκαλική φωσφατάση (ορθοφωσφορικός μονοεστέρας φωσφοϋδρολάση), είναι μια μη ειδική μονοεστεράση που καταλύει την υδρόλυση διαφόρων φωσφορικών εστέρων και ανυδριτών φωσφορικού οξέος, υπό αλκαλικές συνθήκες (Junior et al., 2008). Ανήκει στις μη ειδικές φωσφατάσες και βρίσκεται σε αφθονία στη φύση αλλά και σε πολλούς ιστούς του ανθρώπινου σώματος, στα νεφρά, στα οστά και στα κύτταρα του αίματος καθώς και στο γάλα (Shakeel-Ur Rehman et al., (2003) και σε άλλα σωματικά υγρά από πολλούς οργανισμούς σε ποικίλα επίπεδα.

Η ALP διακρίνεται σε τέσσερα ισόενζυμα, ανάλογα με τον ιστό στον οποίο εκφράζονται. Έτσι, διακρίνουμε την εντερική ALP, την ALP του πλακούντα, την ALP των μικροβιακών κυττάρων, καθώς και την ALP ήπατος/οστού/νεφρού. Ειδικά η εντερική αλκαλική φωσφατάση υπάρχει σε αρκετά υψηλά επίπεδα στους εντερικούς ιστούς και αποτελεί ένα θερμοανθεκτικό και θερμο-σταθερό ένζυμο (Sharma et al., 2014). Η αλκαλική φωσφατάση των θηλαστικών προέρχεται κυρίως από το έντερο ή τον πλακούντα επειδή αυτά τα δύο όργανα είναι πλούσια σε ένζυμα. Έχει μεγάλη τεχνολογική σημασία γιατί οι συνθήκες αδρανοποίησης της είναι λίγο υψηλότερες από αυτές που απαιτούνται για την αδρανοποίηση των πιο ανθεκτικών παθογόνων μικροοργανισμών του γάλακτος *Coxiella burnetii* και *Mycobacterium tuberculosis* τα οποία απαντώνται στο γάλα (Harding F., 1991). Η αφθονία στη φύση και η σημασία αυτού του ενζύμου στα βιολογικά συστήματα έχει κάνει τους προσδιορισμούς της δραστηριότητας της ALP μια από τις πιο συνηθισμένες δοκιμές ενζύμων (Miggiano et al., 1983). Η αλκαλική φωσφατάση αποτελεί ένα από τα πολλά (πάνω από 60) ενδογενή ένζυμα που περιέχονται στο νωπό βόειο γάλα (Schlimme et al., 1997).

Καταστρέφεται κατά την παστερίωση του γάλακτος και η αδρανοποίηση της χρησιμοποιείται από τη νομοθεσία ως δείκτης για την αξιόπιστη παστερίωση του γάλακτος. Σύμφωνα με το πρότυπο ISO 11816-1 για το αγελαδινό γάλα, ένα αποτέλεσμα θεωρείται αρνητικό όταν η μετρούμενη δραστηριότητα ALP είναι ≤ 350 (mU/L). Η καθαρότητα της ALP των βοοειδών βρέθηκε να έχει μοριακή μάζα 187 kDa και ένα ισοηλεκτρικό σημείο που κυμαίνεται από pH 5,4 έως 6,0 (Vega Warner

et al., 1999). Έχει μέγιστη δραστηριότητα σε pH με εύρος από 9,65 έως 10,1 στους 37 ° C (Vega Warner et al., 1999). Σ αυτή την ενεργή μορφή, το μόριο της ALP των βοοειδών σχηματίζει σύμπλοκα με άτομα ψευδαργύρου που προσδίδουν δομική ακεραιότητα και λειτουργικές ιδιότητες.

Όπως προαναφέρθηκε, η αλκαλική φωσφατάση είναι ελαφρώς πιο ανθεκτική στη θερμική επεξεργασία από τα παθογόνα βακτήρια στα οποία βασίζονται οι αξιόπιστες διαδικασίες παστερίωσης και γι' αυτό η θερμική αδρανοποίηση της ALP του γάλακτος συσχετίζεται καλά με τον θερμικά επαγόμενο βακτηριακό θάνατο (VanBever AK, 1943). Μια πρόσφατη εργασία, έχει επίσης βρει παρόμοιες συσχετίσεις συγκρίνοντας τις αποκρίσεις αδρανοποίησης των *Salmonella senftenberg* και *Listeria monocytogenes* (Eckner KF, 1992). Η θερμική αδρανοποίηση της αλκαλικής φωσφατάσης έχει βρεθεί ότι ακολουθεί την κινητική πρώτης τάξης και το μέσο σημείο αδρανοποίησής της έχει ληφθεί στους 56 ° C με θέρμανση 30 λεπτών. (Marchand et al., 2009).

1.5.1 Δραστηριότητα ALP σε μη αγελαδινό γάλα

Οι Vamvakaki et al., (2006) ανέφεραν ότι το γάλα μεμονωμένων αγελάδων μπορεί να διαφέρει έως και 40 φορές ως προς την περιεκτικότητα σε ALP. Συγκρίνοντας τα επίπεδα ALP στο αγελαδινό, πρόβειο και κατσικίσιο γάλα, το νωπό πρόβειο γάλα έχει την υψηλότερη και το νωπό αιγοπρόβειο γάλα τη χαμηλότερη περιεκτικότητα σε ALP σύμφωνα με τους Assis et al., (2000), Vamvakaki et al., (2006), Klotz et al., (2008) and Lorenzen et al., (2010). Συγκεκριμένα, αναφέρεται από τους συγγραφείς ότι η δραστηριότητα της ALP στο νωπό πρόβειο γάλα είναι περίπου τρεις φορές υψηλότερη και στο αιγοπρόβειο περίπου πέντε φορές χαμηλότερη και είναι πολύ μεταβλητή μεταξύ των φυλών. Επίσης, αναφέρεται ότι επηρεάζεται από την εποχή, το στάδιο της γαλουχίας και την περιεκτικότητα σε λιπαρά. Επιπροσθέτως, διαφορές στα βασικά επίπεδα ALP στο νωπό γάλα από πρόβατα και κατσίκες που οφείλονται στη διαφορετικότητα των φυλών αλλά και σε εποχικές επιπτώσεις καθώς και στο στάδιο της γαλουχίας που επηρεάζει τη σύνθεση και την απόδοση του γάλακτος παρατηρήθηκαν και από τους Berger et al., (2008). Οι συγγραφείς ανέφεραν ότι οι διαφορές κατά τη διάρκεια του έτους ήταν χαμηλότερες την άνοιξη και το φθινόπωρο και υψηλότερες το καλοκαίρι. Η δραστηριότητα της ALP στο πρόβειο γάλα κατά τη διάρκεια της γαλουχίας αυξάνεται περίπου από 8.000

έως 17.000 μg φαινόλης / ml (Klotz et al.,2008). Η δραστηριότητα της ALP στο κατσικίσιο γάλα κατά τη διάρκεια της γαλουχίας, αυξάνεται στην όψιμη γαλουχία. (Ying et al., 2002, Persson et al.,2014).

Επίσης, η δραστηριότητα της ALP στα αιγοπρόβατα έχει αναφερθεί ότι αυξάνεται κατά τη διάρκεια μιας λοίμωξης (Katsoulos et al.,2010, Narenji Sani et al.,2018). Το ίδιο παρατηρήθηκε και σε βουβαλίσιο γάλα από τους Patil et al.,(2015) αλλά και σε γάλα από καμήλες με λοιμώξεις από μαστίτιδα από τους Ali et al., (2016). Γενικά, το κατσικίσιο γάλα έχει χαμηλότερη δραστηριότητα ALP σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα (Mathur, 1974,Williams,1986). Οι Raynal Ljutovaca et al.,(2007) ανέφεραν σημαντικές διαφορές στο περιεχόμενο ALP μεταξύ ειδών, φυλής εντός ειδών και μεμονωμένων ζώων. Τα εύρη των συγκεντρώσεων της αλκαλικής φωσφατάσης που έχουν βρεθεί από έρευνες στα αιγοπρόβατα και στο αγελαδινό γάλα ήταν 115 έως 1.300 μg φαινόλης/ml για το αίγιο γάλα, 8.300 έως 17.300 μg φαινόλης/ml για το πρόβιο γάλα και 1.800 έως 4.750 μg φαινόλης /ml για το αγελαδινό γάλα αντίστοιχα, και προφανώς δεν σχετίζονται με την περιεκτικότητα σε λίπος των δειγμάτων γάλακτος.

Έχουν γίνει λιγότερες μελέτες σε γάλα βουβάλου παρά σε γάλατα κατσίκας και προβάτου. Μία μελέτη για το βουβαλίσιο γάλα έδειξε ότι η δραστηριότητα της ALP είναι γενικά ελαφρώς μικρότερη σε σχέση με το αγελαδινό γάλα και ότι η ALP συγκεντρώθηκε στην κρέμα (Sharma and Ganguli,1974) . Οι Lombardi et al.,(2000) επίσης ανέφεραν το ίδιο για την δραστηριότητα της ALP στο βουβαλίσιο γάλα. Επίσης, οι Sharma et al.,(2009) ανέφεραν ότι η δραστηριότητα του ενζύμου ALP στο κατσικίσιο γάλα ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ό, τι στο αγελαδινό ή στο βουβαλίσιο γάλα.

Όσον αφορά στην εκτίμηση της ALP στο νοπό γάλα των ιπποειδών και κατ' επέκταση στο ονόγαλα μια μελέτη από τους Marchand et al.,(2009) έδειξε ότι η δραστηριότητα της ALP σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα ήταν πολύ χαμηλότερη καθώς επίσης και η κατανομή των ενζύμων στο γάλα ήταν τελείως διαφορετική. Αυτό είναι πολύ πιθανό να οφείλεται και στο μικρότερο ποσοστό λίπους που ανευρίσκεται στο συγκεκριμένο είδος γάλακτος. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε με κλασματοποίηση σε φυγοκέντρο, τόσο σε γάλα με λιπαρά, όσο και σε αποβουτυρωμένο γάλα.

Επίσης, οι μελέτες που αφορούν στην αξιολόγηση της δραστηριότητας ALP στο γάλα καμήλας είναι περιορισμένες τόσο στο νωπό, όσο και στο παστεριωμένο γάλα. Μια από αυτές τις έρευνες που πραγματοποιήθηκε από τους Lorenzen et al.,(2010) έδειξε πως οι τιμές της ALP στο παστεριωμένο γάλα, δεν παρουσίαζαν μεγάλη απόκλιση από εκείνες που ανευρέθηκαν στο νωπό γάλα και κυμαίνονταν μεταξύ 15,9 και 24,3 U/L σε νωπό γάλα και 5,8–10,2 U/L σε παστεριωμένο γάλα. Γενικά, πολλά από τα δεδομένα που αναφέρονται σε μη αγελαδινό γάλα δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί διεξοδικά.

1.5.2 Επίδραση του λίπους στην ALP

Οι Painter και Bradley (1997) απέδειξαν ότι τα αυξανόμενα επίπεδα λίπους έχουν ως αποτέλεσμα την αυξημένη υπολειμματική δραστηριότητα ALP. Προϊόντα με αυξημένα επίπεδα λίπους μπορούν να έχουν υψηλότερες αρχικές τιμές ALP. Υπολειπόμενες τιμές ALP σε μη λιπαρό γάλα έχουν αναφερθεί ότι είναι περίπου 50% χαμηλότερες από το συνολικό γάλα όταν παστεριώνεται σε ελάχιστο HTST χρόνο και θερμοκρασία σύμφωνα με τις απαιτήσεις (Painter and Bradley, 1997). Δεδομένου ότι η ALP στο αγελαδινό γάλα αναφέρεται ότι σχετίζεται με τη μεμβράνη των σφαιριδίων του λίπους γάλακτος, αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ALP να συγκεντρώνεται στη φάση της κρέμας (Kosikowski, 1988). Οι Painter and Bradley(1997) και οι Marchand et al.,(2009) ανέφεραν ότι περίπου το 40% της δραστηριότητας ALP σχετίζεται με το κλάσμα λίπους στο νωπό αγελαδινό γάλα.

Αντιθέτως, οι Claeys et al.,(2002) ανέφεραν ότι παρόλο που το πλήρες γάλα παρουσιάζει υψηλότερες αρχικές δραστηριότητες ALP από ό, τι το μη λιπαρό γάλα, η περιεκτικότητα σε λιπαρά μπορεί να μην είναι ο μοναδικός παράγοντας που επηρεάζει το αποτέλεσμα της δοκιμής της αλκαλικής φωσφατάσης του παστεριωμένου γάλακτος. Οι Sharma et al.,(2009) διαπίστωσαν ότι η δραστηριότητα της ALP στο αποβουτυρωμένο αγελαδινό γάλα ήταν 47% στο πλήρες γάλα και 5% στην κρέμα, ενώ η δραστηριότητα της ALP στο αποβουτυρωμένο γάλα κατσίκας ήταν 56% στο πλήρες γάλα και 10% στην κρέμα.

Ομοίως, οι Dumitrașcu et al. (2014) απέδειξαν ότι η δραστηριότητα της ALP στο αποβουτυρωμένο γάλα ήταν 63%, 70% και 59% αυτής στο πρόβειο, αιγοπρόβειο και αγελαδινό γάλα, αντίστοιχα. Ως αποτέλεσμα αυτής της διαφοράς στη δραστηριότητα,

το όριο των 350 mU/L είναι πολύ υψηλό για το αποβουτυρωμένο γάλα. Από την άλλη πλευρά, καθώς η δραστηριότητα ALP στην νωπή κρέμα είναι πολύ μεγαλύτερη από ό,τι στο νωπό γάλα, σε αυτή την περίπτωση το όριο θα πρέπει να είναι υψηλότερο από 350 mU/L. Η περιεκτικότητα σε λίπος έχει επίσης αποδειχθεί ότι συσχετίζεται θετικά με τα επίπεδα ALP στο πρόβειο (Anifantakis and Rosakis, 1983, IZSLT, 2020) και στο παστεριωμένο γάλα αιγοπροβάτων (σύμφωνα με τον Dr. Gilberto Giangolini (Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana 'M. Aleandri', IZSLT). Ειδικά για το αιγοπρόβειο γάλα, η περιεκτικότητα σε λιπαρά ποικίλλει ανάλογα με τη φάση της γαλουχίας, παρόμοια με άλλα συστατικά του γάλακτος.

Στην περίπτωση του γάλακτος αλόγου δεν υπάρχει συγκεκριμένη συσχέτιση της ALP με το κλάσμα λίπους ή τη σφαιρική μεμβράνη του λίπους του γάλακτος σύμφωνα με τους Marchand et al.,(2009). Οι τιμές ALP στο κατσικίσιο γάλα έχει αναφερθεί ότι ποικίλλουν ευρέως με λίγη ή καθόλου συσχέτιση με το λίπος του γάλακτος, το συμπυκνωμένο γάλα χωρίς λιπαρά και απόδοση με ελάχιστη εποχιακή επίδραση (Williams and Nottingham, 1990). Η Barbosa (2005) πρότεινε ότι οι διαφορές στην περιεκτικότητα σε λιπαρά στο γάλα των αιγοπροβάτων που χρησιμοποιείται για άμεση ανθρώπινη κατανάλωση ή η παραγωγή τυριών επηρεάζουν τις επιδόσεις στις διαθέσιμες δοκιμές ALP.

1.5.3 Θερμική αδρανοποίηση ALP

Αν και η ALP χρησιμοποιείται ευρέως ως δείκτης σωστής παστερίωσης, έχουν δημοσιευθεί μόνο λίγες κινητικές μελέτες σχετικά με τη θερμική αδρανοποίηση της ALP στο νωπό αγελαδινό γάλα. Η θερμική αδρανοποίηση της ALP ακολουθεί την κινητική πρώτης τάξης και το ενδιάμεσο σημείο μετουσίωσης έχει ληφθεί στους 56 °C για 30 λεπτά θέρμανση (Levieux et al., 2007). Οι Claeys et al. (2002), ανέφεραν ότι οι τιμές z κυμαίνονται μεταξύ 5 και 6,7°C και μεταξύ 8,5 και 9,5°C, ανεξάρτητα από τον προσδιορισμό ALP που εφαρμόστηκε.

Οι Vamvakaki et al.,(2006) μελέτησαν τη μείωση της δραστηριότητας ALP χρησιμοποιώντας θερμική επεξεργασία στους 59°C για 5-80 λεπτά σε δείγματα των 5 ml των τριών τύπων γάλακτος (αγελαδινό, κατσικίσιο και πρόβειο) και διαπίστωσαν ότι η αδρανοποίηση της ALP ήταν πιο αργή στο αγελαδινό γάλα σε σύγκριση με αυτή του αιγοπρόβειου γάλακτος. Χρησιμοποιώντας την αυτοματοποιημένη

φθοριομετρική μέθοδο (IDF 155A:1999), η μείωση της δραστηριότητας της ALP ήταν ελαφρώς υψηλότερη στο αγελαδινό γάλα σε σύγκριση με το κατσικίσιο και το πρόβειο γάλα, ενώ χρησιμοποιώντας τη μέθοδο φαινόλης IDF (IDF 63:1971), η μείωση της δραστηριότητας της ALP ήταν υψηλότερη στο αγελαδινό γάλα ακολουθούμενη από το κατσικίσιο γάλα και στη συνέχεια στο πρόβειο γάλα.

Οι Wilińska et al., (2007) διερεύνησαν τη θερμική αδρανοποίηση της ALP στο νωπό αγελαδινό και αιγοπρόβειο γάλα στην περιοχή θερμοκρασίας 54–69°C για 1–180 λεπτά και παρατήρησαν διαφορετική δομή για την ALP, η οποία αντικατοπτρίστηκε από υψηλότερη σταθερότητα στο αγελαδινό γάλα σε σύγκριση με το κατσικίσιο γάλα. Με βάση αυτά τα αποτελέσματα οι τιμές D ήταν χαμηλότερες για το κατσικίσιο γάλα σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα και η τιμή z ήταν υψηλότερη για το αγελαδινό γάλα (6,0°C) σε σύγκριση με το κατσικίσιο γάλα (5,6°C).

Οι Dumitrașcu et al. (2014) πραγματοποίησαν κινητικές μελέτες θερμικής αδρανοποίησης ALP χρησιμοποιώντας μια φθοριομετρική τεχνική σε αποβουτυρωμένο και πλήρες γάλα που προέρχεται από αγελάδες, πρόβατα και κατσίκες στους 60–72,5°C για 0–40 λεπτά. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία τόσο μειώνεται η δραστηριότητα της ALP. Η αδρανοποίηση της ALP επηρεάστηκε από την περιεκτικότητα σε λίπος σε χαμηλότερες θερμοκρασίες, δηλαδή μετά από 30 λεπτά επεξεργασίας πλήρους γάλακτος στους 60°C, η υπολειμματική δραστηριότητα ήταν υψηλότερη στο κατσικίσιο γάλα (44,8%) σε σύγκριση με το πρόβειο (21,7%) και το αγελαδινό (28,1%) γάλα ενώ, στις ίδιες συνθήκες θέρμανσης για το αποβουτυρωμένο γάλα, η ALP στο κατσικίσιο γάλα παρουσίασε τη χαμηλότερη υπολειμματική δραστηριότητα (5,9%), ακολουθούμενο από το πρόβειο γάλα (7,6%). Η δραστηριότητα ALP στο αγελαδινό γάλα ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη (16,78%). Επίσης, στους 72,5°C για 20 δευτερόλεπτα, η δραστηριότητα ALP στο πλήρες και στο αποβουτυρωμένο γάλα μειώθηκε σε 9,1 και 11,8% στο πρόβειο, σε 18,5 και 19,0% στο κατσικίσιο και σε 25,5 και 22,2% στο αγελαδινό γάλα. Σε αυτή το συνδυασμό θερμοκρασία-χρόνου, η αδρανοποίηση της ALP δεν επηρεάστηκε από την περιεκτικότητα σε λίπος, αλλά παρατηρήθηκε ότι η ALP είναι πιο ανθεκτική στο αγελαδινό γάλα σε σύγκριση με το κατσικίσιο και το πρόβειο γάλα.

Ορισμένες αναφορές επίσης, προτείνουν ότι η ALP στο πρόβειο γάλα είναι ελαφρώς πιο ευαίσθητη στη θερμική μετουσίωση από αυτή στο αγελαδινό γάλα (Anifantakis and Rosakis,1983).

Οι Lombardi et al.,(2000) αξιολόγησαν τις δραστηριότητες και τα ποσοστά αδρανοποίησης της ALP στο νωπό γάλα βουβάλου και διαπίστωσαν ότι στους 60 ° C, η ALP έδειξε την υψηλότερη ευαισθησία στη θερμική αδρανοποίηση και στους 70 ° C η ALP ήταν πλήρως αδρανοποιημένη. Επίσης, άλλες έρευνες έδειξαν ότι το πρότυπο της θερμικής αδρανοποίησης των μεμονωμένων ενζύμων από βοοειδή, βουβάλια και κατσίκες ήταν παρόμοιο.

Οι Lorenzen et al.,(2011) σύγκριναν τα αποτελέσματα μιας ισοθερμικής θέρμανσης σε 9 ml δειγμάτων σε δοκιμαστικούς σωλήνες με διαφορετικούς συνδυασμούς χρόνου και θερμοκρασίας στις υπολειμματικές δραστηριότητες ALP στο αγελαδινό, το πρόβειο και το αιγοπρόβειο γάλα. Το αποτέλεσμα για τις υπολειμματικές δραστηριότητες στο γάλα και για τα τρία είδη ήταν < 0,03% και ότι η θερμική σταθερότητα της ALP στο αγελαδινό γάλα ήταν χαμηλότερη απ' ό,τι στο αιγοπρόβειο γάλα. Οι λίγες μελέτες που συνέκριναν τη θερμική σταθερότητα της ALP στο γάλα που προέρχεται από αγελάδες, πρόβατα και κατσίκες δείχνουν αντικρουόμενα στοιχεία σχετικά με το εάν η ALP αδρανοποιείται πιο εύκολα στο αγελαδινό γάλα σε σύγκριση με το πρόβειο και κατσικίσιο γάλα. Γενικά, τα αποτελέσματα φαίνεται να δείχνουν ότι η θερμική απενεργοποίηση της ALP από αγελαδινό, κατσικίσιο και πρόβειο γάλα είναι περίπου παρόμοια και ότι η ALP του αλόγου είναι πιο ευαίσθητη στη θερμότητα (EFSA, 2021). Ωστόσο, χρειάζεται περισσότερη διερεύνηση για τις μεγάλες διακυμάνσεις στα επίπεδα ALP μεταξύ των ειδών (EFSA, 2021).

Οι Lorenzen et al.,(2011a) αξιολόγησαν την υπολειμματική δραστηριότητα της ALP σε νωπό και παστεριωμένο γάλα καμήλας και οι τιμές της ALP κυμάνθηκαν μεταξύ 15,9 και 24,3 U/L σε νωπό γάλα και 5,8–10,2 U/L με παστεριωμένο γάλα. Σε άλλη μελέτη για το γάλα καμήλας από τους Wernery et al.,(2008) επιβεβαιώθηκε ότι η ALP δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της σωστής παστερίωσης, καθώς απαιτούνται πολύ μεγαλύτερες θερμοκρασίες από αυτές που απαιτούνται για την αδρανοποίηση της ALP στο αγελαδινό γάλα. Οι συγγραφείς προτείνουν τη χρήση

άλλων ένζυμων όπως η λακτουπεροξειδάση (POD) ή γ- γλουτάμυλο-τρανσφεράση ως πιο κατάλληλους δείκτες για την παστερίωση του γάλακτος στις καμήλες.

Οι Marchand et al.,(2009) αξιολόγησαν την κινητική αδρανοποίησης της ALP σε νοπό πλήρες γάλα αλόγου και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η ALP αλόγου αδρανοποιείται πιο εύκολα σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα και, λαμβάνοντας υπόψη το μάλλον χαμηλό επίπεδο της ALP στο αλογίσιο γάλα, ότι η ALP αλόγου δεν θα είναι κατάλληλη ως δείκτης για τη σωστή παστερίωση του γάλακτος αλόγου.

Επίσης, η ενδογενής ALP του γάλακτος μπορεί να αδρανοποιηθεί με επεξεργασία υψηλής πίεσης στην περιοχή από 400 έως 800 MPa και σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 5 και 40 ° C (Rademacher and Hinrichs, 2006).

1.5.4 Όρια ALP σε μη αγελαδινό παστεριωμένο γάλα

Όπως προαναφέρθηκε, για το αγελαδινό γάλα, ένα αρνητικό αποτέλεσμα είναι όταν η μετρούμενη δραστηριότητα ALP είναι ≤ 350 (mU/L) χρησιμοποιώντας το πρότυπο ISO 11816-1. Οι Berger et al., (2008) και Klotz et al.,(2008) επιβεβαίωσαν ότι η ALP θα ήταν χρήσιμη για την αξιολόγηση της σωστής παστερίωσης στο κατσικίσιο γάλα. Αντίθετα, οι Banks και Muir (2002) αναφέρουν ότι το όριο για τη σωστή παστερίωση θα πρέπει να προσαρμοστεί. Το ίδιο αναφέρεται και από τους Vamvakaki et al.,(2006) και Berger et al.,(2008) για το πρόβειο γάλα, καθώς παρατηρήθηκε ότι η παστερίωση μείωσε τη δραστηριότητα της ALP, αλλά δεν ήταν κάτω από 350 mU/L μετά την παστερίωση. Επιπλέον, σύμφωνα με τα αποτελέσματα μιας μελέτης από τους IZSLT, (2020) για την υπολειμματική δραστηριότητα της ALP, μετά την παστερίωση, οι συγγραφείς έχουν προτείνει όρια στο γάλα από διάφορα είδη:

- Βουβαλίσιο γάλα ≤ 380 mU/L
- Κατσικίσιο γάλα ≤ 330 mU/L
- Πρόβειο γάλα ≤ 530 mU/L

Υποθέτοντας ότι η αδρανοποίηση του παθογόνου θα είναι η ίδια στο γάλα διαφορετικών ειδών και με βάση μόνο τα διαθέσιμα στοιχεία, υπάρχει 95-99% πιθανότητα (εξαιρετικά πιθανό) ότι το παστεριωμένο κατσικίσιο και το παστεριωμένο

πρόβειο γάλα θα έχουν δραστηριότητα ALP κάτω από 300 mU/L και κάτω από 500 mU/L, αντίστοιχα (EFSA, 2021). Για το γάλα αλόγου και καμήλας, η ALP δεν φαίνεται να είναι καλός δείκτης για την παστερίωση, λόγω της πολύ χαμηλής δραστηριότητας που μετράται στο νωπό γάλα (Marchand et al., 2009, Lorenzen et al., 2011a). Επιπλέον, οι Wernery et al., (2006) χρησιμοποιώντας τέσσερα διαφορετικά συστήματα δοκιμών (φθορισμομετρική, φωτομετρική και δύο χρωματομετρικές μεθόδους) έδειξαν ότι η ALP στο γάλα καμήλας δεν αδρανοποιείται πλήρως στους 72°C, που είναι η αποδεκτή θερμοκρασία για την παστερίωση HTST.

1.5.5 Επανενεργοποίηση ALP

Επειδή το αποτέλεσμα της ανάλυσης ALP είναι ενδεικτικό για την αποτελεσματικότητα της παστερίωσης του γάλακτος, η πιθανότητα να ληφθούν θετικά τεστ λόγω επανεργοποίησης της ALP μπορεί επίσης να είναι ένα πρόβλημα κατά τη δοκιμή της δραστηριότητας αυτού του ενζύμου στα γαλακτοκομικά προϊόντα.

Οι Wright and Tramer (1953) ήταν οι πρώτοι που αναγνώρισαν την επανενεργοποίηση της ALP. Ανέφεραν ότι το παστεριωμένο γάλα μπορεί να είναι θετικό για δραστηριότητα ALP όταν αποθηκεύεται σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 22 έως 37 ° C, ακόμη και όταν υπάρχει αρνητικό αποτέλεσμα ALP για το ίδιο παστεριωμένο γάλα. Ωστόσο, αυτή η έρευνα δεν μπόρεσε να αποδείξει μια συσχέτιση μεταξύ της επανενεργοποίησης, χρόνος/θερμοκρασία παστερίωσης ή του χρόνου αποθήκευσης μετά τη διαδικασία, αλλά συνήχθη το συμπέρασμα ότι το γάλα που παστεριώθηκε σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 71,7°C είναι πιο επιρρεπές στην επανενεργοποίηση ALP. Επιπλέον, οι Lyster & Aschaffenburg, (1962) και οι Murthy et al., (1976) ανέφεραν την επανενεργοποίηση της ALP στο γάλα ή στα γαλακτοκομικά προϊόντα μετά από θέρμανση.

Έχει αναφερθεί ότι τα μεταλλικά ιόντα (π.χ. το οξικό μαγνήσιο) φαίνεται να παίζουν ρόλο στην επανενεργοποίηση της ALP (Richardson et al., 1964, Kuzuya et al., 1982). Τα Mg²⁺ και Zn²⁺ θα διεγείρουν την επανενεργοποίηση της ALP, ενώ τα Co²⁺, Cu²⁺, EDTA και Sn²⁺ μπορεί να αναστείλουν την επανενεργοποίηση της ALP (Sharma and Ganguli, 1974, Linden et al., 1977, Linden, 1979, Murthy and Peeler 1979, Fox and Kelly, 2006, EFSA, 2021). Συγκεκριμένα, όσον αφορά την ενεργοποίηση του Mg²⁺, έχει βρεθεί πως κυρίως η ALP του αγελαδινού και του πρόβειου γάλακτος διεγείρονται έντονα από την παρουσία μαγνησίου. Όσο

περισσότερο εξαλείφεται το ένζυμο, τόσο μεγαλύτερο είναι το ερέθισμα, οδηγώντας στην επανενεργοποίηση (Linden & Alais,1978).

Οι Deeth και Lewis (2017) ανέφεραν επανενεργοποίηση μετά από επεξεργασία με UHT, και συμπέραναν ότι αν και η ALP μπορεί να δοκιμαστεί ως αρνητική σε μόλις επεξεργασμένο γάλα UHT, μπορεί στη συνέχεια να είναι θετική σε αποθηκευμένο γάλα UHT.

Σε μια μελέτη οι Lorenzen et al.,(2010) απέδειξαν ότι το πλήρες γάλα (3,5% λιπαρά) με επεξεργασία UHT που αποθηκεύτηκε σε θερμοκρασία περιβάλλοντος για 148 ημέρες παρουσίασε αύξηση στη δραστηριότητα ALP από 20 σε 454 mU/L και στο γάλα με 1,5% λιπαρά από 80 σε 3.248 mU/L. Οι Fox & Kelly,(2006) ανέφεραν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία αποθήκευσης για επανενεργοποίηση είναι 30°C, στην οποία η επανενεργοποίηση μπορεί να αποδειχθεί μετά από 6 ώρες και μπορεί να συνεχιστεί έως και 7 ημέρες. Μια δοκιμή των Rankin et al.,(2010) βασίζεται στην αύξηση της δραστηριότητας ALP που προκύπτει από την προσθήκη Mg²⁺ στο μείγμα αντίδρασης και μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί εάν ένα επίπεδο ALP που υπερβαίνει το νόμιμο όριο αντιπροσωπεύει μια πραγματική αποτυχία παστερίωσης ή εάν οφείλεται σε επανενεργοποίηση. Ωστόσο, μπορεί να προκύψουν δυσκολίες στην ερμηνεία αυτής της δοκιμής όταν εφαρμόζεται σε κρέμα ή βούτυρο.

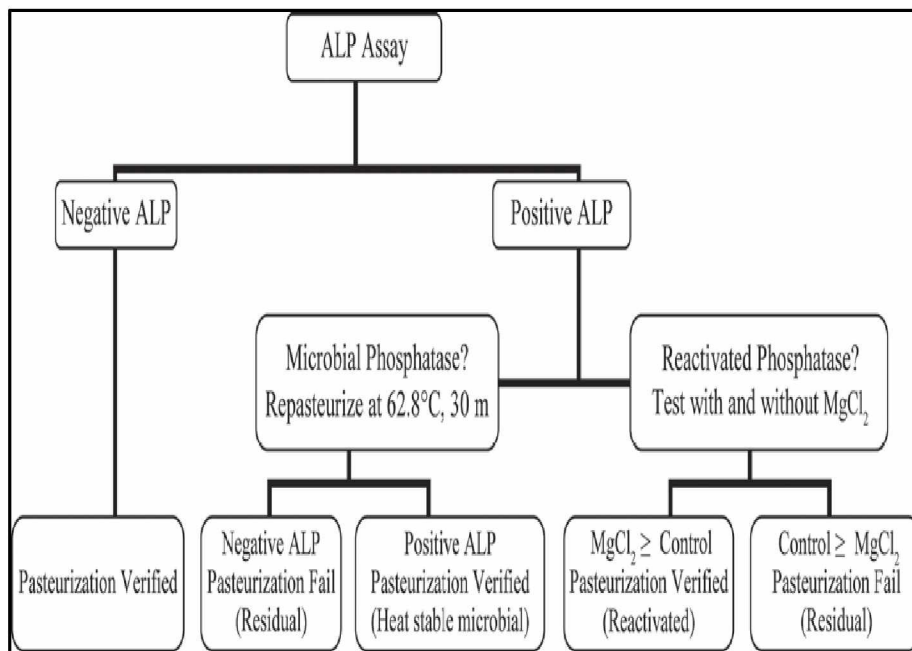
Σύμφωνα με τον Harding (1991), η ανίχνευση αυξημένων επιπέδων ALP ερμηνεύεται κυρίως ως ένδειξη ότι είτε το γάλα δεν είχε παστεριωθεί επαρκώς ή ότι μολύνθηκε με νωπό γάλα μετά την παστερίωση. Άλλες ερμηνείες αυξημένων επιπέδων ALP στα τελικά προϊόντα μπορεί να περιλαμβάνουν την παρουσία βακτηριακής ALP ή και μόλυνση παστεριωμένου προϊόντος με νωπό προϊόν, ως αποτέλεσμα της αποτυχίας του εξοπλισμού παστερίωσης, λάθος χειριστή ή κακή διαχείριση των νωπών και επεξεργασμένων προϊόντων.

Επιπλέον, πιο θεμελιώδεις λεπτομέρειες για την κινητική των ποσοστών μετουσίωσης και επανενεργοποίησης της ALP δεν έχουν ακόμη περιγραφεί διεξοδικά για τα μη βοοειδή (Hilal A. Punoo, 2018) .

1.6 Μέθοδοι προσδιορισμού ALP

Η δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP) έχει υιοθετηθεί από πολλές χώρες ως τον τυπικό προσδιορισμό για την ταχεία αξιολόγηση της παστερίωσης του γάλακτος. Το θεμέλιο για τη δοκιμή της ALP βασίζεται στη θερμική αδρανοποίηση του ενδογενούς ενζύμου στο γάλα. Εν ολίγοις, η ALP είναι ελαφρώς πιο ανθεκτική στη θερμική αδρανοποίηση από τα παθογόνα βακτήρια-στόχους επομένως, εάν οι δραστηριότητες της ALP μειώνονται σημαντικά, μπορεί κανείς να συμπεράνει ότι ο πληθυσμός του βακτηριακού παθογόνου-στόχου είχε τουλάχιστον παρόμοια μείωση και οι νόμιμες θερμικές απαιτήσεις για την παστερίωση είναι ικανοποιητικές (Rankin et al.,2010). Το όριο της δημόσιας υγείας των ΗΠΑ και της Ευρώπης για την αλκαλική φωσφατάση στα παστεριωμένα γάλατα είναι 350 mU / λίτρο. Υπάρχουν πολλά διαφορετικά πρωτόκολλα για τη διεξαγωγή δοκιμών ALP, και το καθένα βασίζεται σε διαφορετικές μεθόδους παρασκευής δείγματος ή υποστρώματος ALP (Rankin et al.,2010). Η ανάλυση ALP επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες, όπως από τη σύνθεση του προϊόντος, την ικανότητα της ALP να ανακτήσει τη δραστηριότητά της και από την παρουσία της μικροβιακής ALP. Αρκετές μελέτες έχουν δείξει ότι η σύνθεση του γάλακτος ή του γαλακτοκομικού προϊόντος μπορεί να επηρεάσει τις αναλύσεις ALP (Punoo,2018).

Οι αναλυτικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανίχνευση της δραστηριότητας της ALP μπορούν να ταξινομηθούν σε 4 τύπους: χρωματομετρικές, φθορισμομετρικές, τεχνικές χημειοφωταύγειας και ανοσοχημικές τεχνικές (Rankin et al.,2010). Αυτές οι τεχνικές έχουν υιοθετηθεί και χρησιμοποιούνται για πολλά χρόνια. Ωστόσο μόνο οι χρωματομετρικές, οι φθορισμομετρικές και οι τεχνικές χημειοφωταύγειας έχουν αναγνωριστεί ως αξιόπιστες τεχνικές επαλήθευσης της παστερίωσης στη γαλακτοβιομηχανία (Rankin et al.,2010). Η δραστηριότητα της αλκαλικής φωσφατάσης εκφράζεται σε mU/L και μια μονάδα δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης ισοδυναμεί με την ποσότητα του ενζύμου που καταλύει τη μετατροπή ενός μmol υποστρώματος/λεπτό (Ritota et al.,2017).



Εικόνα 2. Γενική λογική για τον προσδιορισμό της παστερίωσης των γαλακτοκομικών προϊόντων με τη δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης (ALP). (Rankin et al.,2010)

1.6.1 Χρωματομετρικές τεχνικές

Οι πρώτοι προσδιορισμοί της ALP βασίστηκαν στη χρήση αντιδράσεων ικανών παραγωγής χρωμογόνων προϊόντων. Οι χρωματομετρικές τεχνικές βασίζονται στην πρώτη δοκιμή φωσφατάσης (Kay and Graham, 1935). Σε αυτές τις δοκιμές, η φαινόλη απελευθερώνεται από νατριούχο υπόστρωμα φωσφορικού φαινυλίου και γίνεται αντίδραση με σχηματισμό χρώματος. Ωστόσο, αυτές οι δοκιμασίες έχουν περιορισμένη ευαισθησία και απαιτούν 18 έως 24 ώρες για τη διεξαγωγή του αποτελέσματος.

- **Scharer's Rapid Phosphatase Test**

Η ταχεία δοκιμή φωσφατάσης του Scharer (Scharer, 1938) βασίζεται στην πρωτότυπη μέθοδο αλλά προσφέρει σημαντική μείωση του χρόνου ανάλυσης (~ 75 λεπτά) (Kay and Graham, 1935). Εν συντομία, η ALP διασπά ενζυματικά μια φωσφορική ομάδα από το προστιθέμενο υπόστρωμα φαινυλο-φωσφορικού υποστρώματος. Το τελικό αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ο σχηματισμός ινδοφαινόλης, μιας ένωσης μπλε χρώματος. Υπό τις ελεγχόμενες συνθήκες αυτής της ανάλυσης, η αυξανόμενη δραστηριότητα της ALP στο δείγμα γάλακτος έχει ως

αποτέλεσμα τη δημιουργία όλο και περισσότερου έντονου μπλε χρώματος. Η ένταση του μπλε χρώματος συγκρίνεται οπτικά με ένα σύνολο προτύπων ή διαβάζεται με φασματοφωτόμετρο (Scharer, 1938, Rankin et al., 2010). Τα αποτελέσματα εκφράζονται ως *μικρογραμμάρια φαινόλης ανά χιλιοστόλιτρο* γάλακτος (Payne and Wilbey, 2009, Lakra et al., 2016). Η μέθοδος Scharer (Scharer, 1943) έχει πολλές αδυναμίες που περιορίζουν την εφαρμογή της και την ευρεία αποδοχή της καθώς βασίζεται σε υποκειμενικές οπτικές εκτιμήσεις της ανάπτυξης χρώματος και είναι ιδιαίτερα αναξιόπιστη κοντά στο όριο αντίχρευσσης.

- **Aschaffenburg and Mullen Test**

Σε αυτήν την τεχνική το φωσφορικό ρ-νιτροφαινόλιο χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα για την αντίδραση και την ανάπτυξη ενός κίτρινου χρώματος που χρησιμοποιείται ως δείκτης της απελευθερούμενης νιτροφαινόλης (Aschaffenburg and Mullen, 1949). Αυτή η μέθοδος χαρακτηρίζεται ως ελαφρώς πιο ευαίσθητη και δεν απαιτεί εκχύλιση ή μεγάλες περιόδους επώασης. Αυτή η μέθοδος είναι αποδεκτή σύμφωνα με τα ρυθμιστικά πρότυπα στο Ηνωμένο Βασίλειο (Rocco, 2004). Η δραστηριότητα ποικίλει ανάλογα με το υπόστρωμα και η ισοδύναμη τιμή για το τεστ Aschaffenburg and Mullen είναι 10μg pNP/ml δείγματος (Payne and Wilbey, 2009).

- **Official Canadian Method (MFO-3)**

Σε αντίθεση με τις προηγούμενες χρωματομετρικές τεχνικές που ακολουθούν μια κοινή μεθοδολογία σύμφωνα με τη Διεθνή Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων (IDF, International Dairy Federation), η MFO-3 ακολουθεί διαφορετική μεθοδολογία και αντιδραστήρια για τον προσδιορισμό της ALP. Αυτή η μέθοδος βασίζεται στην αντίχρευση φαινολικών που προκύπτουν από τη δράση της αλκαλικής φωσφατάσης στο φωσφορικό φαινόλιο. Η ποσότητα των φαινολικών που απελευθερώνονται (σε μικρογραμμάρια) στη μονάδα χρόνου (1 ώρα) χρησιμοποιείται αναλογικά για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της αλκαλικής φωσφατάσης στο αρχικό δείγμα (Klotz et al., 2008).

1.6.2 Φθορισμομετρικές τεχνικές

Οι αναλυτικές μέθοδοι που βασίζονται στις ιδιότητες φθορισμού ορισμένων ενώσεων χρησιμοποιούνται εκτενώς στις χημικές και βιολογικές επιστήμες, ειδικά για ενζυματικούς προσδιορισμούς όπου απαιτείται ευαισθησία. Οι Fernley and Walker (1965) δημοσίευσαν μια από τις πρώτες αναλύσεις φθορισμομετρίας για ALP βοοειδών. Οι φθορισμομετρικές αναλύσεις βασίζονται στην ενδιάμεση απελευθέρωση ALP από μια φωσφορική ρίζα από ένα ενδεικτικό υπόστρωμα, προς το σχηματισμό ενός προϊόντος υψηλού φθορισμού, η οποία έχει βέλτιστο φθορισμό σε pH 14 (Yoshitomi, 2004). Για τον προσδιορισμό της αλκαλικής φωσφατάσης στο γάλα και στα γαλακτοκομικά προϊόντα χρησιμοποιείται ως υπόστρωμα ένας φθορισμογόνος αρωματικός ορθοφωσφορικός εστέρας (Rankin et al., 2010). Σε αυτή την τεχνική, μια ένωση φθορισμού, "Fluoro yellow" παράγεται με υδρόλυση από το υπόστρωμα Fluorophos και στη συνέχεια αναλύεται χρησιμοποιώντας φθορισμομετρητή. Η μέτρηση του παράγοντα φθορισμού που παράγεται συνεχώς σχετίζεται με την ενζυματική δραστηριότητα ή την συγκέντρωση της ALP. Αυτός ο συγκεκριμένος φθορισμομετρικός προσδιορισμός αναφέρθηκε ότι είναι πολύ πιο γρήγορος (~ 3 λεπτά) απλός και περίπου 100 έως 1.000 φορές πιο ευαίσθητος από τις χρωματομετρικές αναλύσεις όπως η μέθοδος Scharer (Fox and Kelly, 2006). Ως αποτέλεσμα, αυτή η φθορισμομετρική ανάλυση είναι αρκετά ευαίσθητη για να ανιχνεύσει ακόμη και μικρές παρατυπίες κατά την επεξεργασία γάλακτος (Rocco, 2004). Μία εναλλακτική φθορισμομετρική ανάλυση έχει αναφερθεί από τους Fenoll et al., (2002) για την εναπομένουσα δραστηριότητα ALP σε μια μεγάλη ποικιλία στερεών και υγρών γαλακτοκομικών προϊόντων. Ο συνολικός χρόνος δοκιμής είναι 450 secs και τα όρια ανίχνευσης είναι 0,04, 0,4 και 0,22% (vol/vol) για το νωπό γάλα, το πλήρες γάλα, το σοκολατούχο γάλα και βούτυρο, αντίστοιχα Fenoll et al., (2002). Η μέθοδος Fluorophos έχει αναφερθεί ότι έχει υψηλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα και είναι τόσο ταχύτερη όσο και απλούστερη από τα παραδοσιακά χρωματομετρικά τεστ (Payne and Wilbey, 2009).

Επίκαιρες αναφορές έχουν αποδείξει ότι τα επίπεδα ευαισθησίας του φθορισμομετρικού προσδιορισμού κυμαίνονται από 0,003 έως 0,006% για μόλυνση από νωπό γάλα ή περίπου 25 έως 50mU / L αλκαλικής φωσφατάσης Black et al., (1993), μια σημαντική βελτίωση πάνω από τις χρωματομετρικές μεθόδους, όπου η ευαισθησία κυμαίνεται από 0,1 έως 0,5% (Claeys et al., 2002). Αρχικά, το ανώτατο

όριο για τη δραστηριότητα ALP κατά το Fluorophos ορίστηκε στα 500 mU/L, ισοδύναμο με τα επίπεδα που καθορίζονται για τις παλαιότερες, χρωματομετρικές μεθόδους. Ωστόσο, λόγω της αυξημένης ευαισθησίας της μεθόδου, με όριο ανίχνευσης μόλυνσης σε 0,003% νωπού γάλακτος (Micciche, 2005), η πρόσφατη νομοθεσία επέτρεψε τη μείωση του αποδεκτού ορίου της ALP σε παστεριωμένο γάλα από 500 σε 350 mU/L. Στην πράξη, η φθορισμομετρική μέθοδος επέτρεψε ακριβή μέτρηση στο νόμιμο όριο του 350 mU/L και για τιμές άνω των 100 mU/L για τη διερεύνηση ένδειξης πιθανών προβλημάτων στα συστήματα παστερίωσης (Micciche, 2005).

1.6.3 Τεχνικές Χημειοφωταύγειας

Η χημειοφωταύγεια είναι η βάση για μια ακόμη προσέγγιση για τη μέτρηση της δραστηριότητας της ALP. Αυτή η μεθοδολογία παρέχει μια απλή αντίδραση με όριο ανίχνευσης 12mol (603 molecules) ενζύμου (Kricka, 2003). Μια ανάλυση χημειοφωταύγειας με ευαισθησίες και χρόνους ανάλυσης παρόμοιους με τις μεθόδους φθορισμού αναπτύχθηκε για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης της ALP στο γάλα από τους Girotti et al.,(1994). Τα αποτελέσματα συμφωνούσαν με αυτά που ελήφθησαν από την ποιοτική και ποσοτική φασματομετρία απορρόφησης για την ALP και η μέθοδος της χημειοφωταύγειας έδωσε ποσοτικά αποτελέσματα χωρίς επίπονες λύσεις και προετοιμασία των δειγμάτων. Μια ανάλυση χημειοφωταύγειας (Paslite, Charm Sciences Inc., Lawrence, MA) αξιολογήθηκε και εγκρίθηκε από την FDA /NCIMS και τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης /Διεθνή Ομοσπονδία Γαλακτοκομικών Προϊόντων (ISO22160 / IDF209) και είναι μακράν με το φθορισμομετρικό τεστ, μία από τις 2 τεχνολογίες που αναφέρονται συγκεκριμένα στο 2009 PMO ως αποδεκτή για δοκιμές ALP σε γαλακτοκομικά προϊόντα βαθμού Α.

Μια επιπλέον μέθοδος ταχείας χημειοφωταύγειας έχει επίσης αποκτήσει την αξιοπιστία από το NCIMS το 2009 ως εγκεκριμένη ανάλυση ALP. Αναφέρεται ως Δοκιμή Γρήγορης Αλκαλικής Φωσφατάσης (Fast Alkaline Phosphatase test) (Charm Sciences Inc., Lawrence, MA) και έχει αναφερθεί ότι έχει όριο ανίχνευσης 20mU / L στη δραστηριότητα ALP στο γάλα HTST. Αυτή η γρήγορη ανάλυση απαιτεί ελάχιστο μέγεθος και προετοιμασία δείγματος και αναφέρεται ότι έχει χρόνος απόκρισης 45s (Rankin et al.,2010).

Στις μεθόδους προσδιορισμού EPAS η αλκαλική φωσφατάση υδρολύει τα οργανοφωσφορικά από το υπόστρωμα και παράγει το φωτοενεργοποιημένο προϊόν, το οποίο ανιχνεύεται ενόργανα. Οι μέθοδοι αυτοί μπορούν να εφαρμοστούν σε υποστρώματα στη χημειοφωταύγεια αλλά και στη φθορισμομετρία. Οι μονάδες μέτρησης του ενζύμου είναι τα miliunits/λίτρο γάλακτος (mU/L). Κάθε miliunit εκφράζει την ποσότητα του ενζύμου που καταλύει 1 ng του ειδικού υποστρώματος που υδρολύεται ανά λίτρο του διαλύματος και ανά λεπτό (Albillos et al., 2011). Η εγκυρότητα τόσο των χρωματομετρικών όσο και των φθορισμομετρικών δοκιμών (EPAS) για το αγελαδινό, το αίγιο και το πρόβιο γάλα αξιολογήθηκε πρόσφατα με βελτιωμένη ευαισθησία και αναπαραγωγικότητα χρησιμοποιώντας την αρχή του EPAS (Albillos et al., 2011).

Τόσο οι μέθοδοι EPAS φθορισμού όσο και χημειοφωταύγειας έχουν παρόμοιες τιμές επαναληψιμότητας και αναπαραγωγικότητας σε αναλύσεις πλήρους γάλακτος πολλαπλών ειδών που ισχύουν για χαμηλότερα επίπεδα ανίχνευσης ALP για τη δημόσια ασφάλεια που έχουν υιοθετηθεί στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, και προτείνονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση. Επιπρόσθετα χαμηλότερα όρια ελέγχου είναι εφικτά στα 50 και 100 mU / L (Salter and Fitchen ,2006).

1.6.4 Ανοσοχημικές τεχνικές

Τα πλεονεκτήματα του Ενζυματικού Ανοσοπροσροφητικού Προσδιορισμού (ELISA) είναι η αυξημένη ευαισθησία και η εξειδίκευση. Με βάση την αντιγονική φύση του μορίου της ALP, οι Vega-Warner et al., (2000) απέδειξαν την ικανότητα της έμμεσης (CI) ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) να κάνει διακρίσεις μεταξύ μικροβιακής ALP και ALP γάλακτος, ένα χαρακτηριστικό που οι προηγούμενες μέθοδοι δεν μπορούν να επιτύχουν άμεσα. Ωστόσο, οι μέθοδοι CI-ELISA (Vega-Warner et al., 2000) έχουν αναπτυχθεί σε ένα σχετικά απλό μοντέλο συστημάτων και δεν έχουν ακόμη επικυρωθεί σε πραγματικά τρόφιμα όπως το γάλα. Η τεχνολογία CI-ELISA χρησιμοποιεί αντισώματα ειδικά για την αλκαλική φωσφατάση αγελαδινού γάλακτος. Με τη λήψη μιας ανοσοσφαιρίνης, ειδικής για το αγελαδινό γάλα (BM-ALP), η CI-ELISA αποδείχθηκε αποτελεσματική στη διαφοροποίηση μεταξύ BM-ALP και την ALP του βακτηρίου *E. Coli*. Ακόμη, ήταν δυνατή και η ποσοτικοποίηση του BM-ALP, σε αυτές τις συνθήκες (Chen et al., 2006). Προς το παρόν δεν υπάρχει εγκεκριμένη ανοσοχημική δοκιμασία για την

αξιολόγηση της δραστηριότητας ALP στο γάλα ή στα γαλακτοκομικά προϊόντα (Rankin et al.,2010).

1.7 Εφαρμογές και περιορισμοί των μεθόδων προσδιορισμού ALP

Συνοψίζοντας, ο προσδιορισμός της ALP έχει αποδειχθεί ότι είναι ένα εξαιρετικά πολύτιμο εργαλείο για την τακτική αξιολόγηση της επαλήθευσης της παστερίωσης του γάλακτος, ωστόσο υπάρχουν κάποιες ανησυχίες. Η συνετή εφαρμογή των δοκιμών της αλκαλικής φωσφατάσης πρέπει να βασίζεται στην κατανόηση της ανάλυσης της και των περιορισμών της. Μια πρόσθετη μελέτη (Klotz et al.,2008) για αγελαδινό, κατσικίσιο και πρόβειο γάλα προτείνει επίσης ότι το παρόν όριο των 350 mU / L μπορεί να μειωθεί περαιτέρω δεδομένου ότι τα επίπεδα ALP νωπού γάλακτος κασίικας ήταν <350 mU / L. Η υψηλή ευαισθησία των μεθόδων της φθορισμομετρίας και χημειοφωταύγειας έχει επίσης παρακινήσει μια τέτοια εκτίμηση. Ειδικότερα, για την αξιολόγηση των θερμικών επεξεργασιών στο γάλα δίνεται προσοχή στις φασματοσκοπικές τεχνικές (UV-Vis και φθορισμός), επειδή είναι γρήγορες μέθοδοι και δεν απαιτούν μεγάλη προετοιμασία δειγμάτων και άλλες αναλυτικές μεθοδολογίες, κυρίως χρησιμοποιώντας τη φασματομετρία μάζας. Τα πιο ακριβή αποτελέσματα ανάλυσης ALP είναι αυτά που έχουν γίνει στο προϊόν αμέσως μετά τη θερμική επεξεργασία, πριν από το χρόνο αποθήκευσης και η μικροβιακή ανάπτυξη μπορεί να επιτρέψει τις εξωγενείς δραστηριότητες της ALP να εμφανιστούν (δηλ. χρόνος ανάλυσης 0). Τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Επιτροπής (2007) αναφέρονται στη φθορισμομετρική μέθοδο σύμφωνα με τον Διεθνή Οργανισμό για την τυποποίηση 118161 ως εγκεκριμένο μέσο δοκιμών.

Η αλκαλική φωσφατάση παράγεται από πολλά βακτηριακά στελέχη, και σε πολλές περιπτώσεις, παρουσιάζει υψηλότερη θερμική σταθερότητα από την ALP των βοοειδών, αυξάνοντας ενδεχομένως την επίπτωση από τα θετικά αποτελέσματα. Έτσι οι μέχρι σήμερα αναφορές δείχνουν ότι ορισμένα βακτηριακά κύτταρα παράγουν θερμοανθεκτική αλκαλική φωσφατάση, καθιστώντας δύσκολη τη διαφοροποίηση από τα υπολείμματα της ALP των βοοειδών (Knight and Fryer,1989). Σαν αποτέλεσμα, ο Αμερικανικός Οργανισμός Δημόσιας Υγείας συνιστά την εκ νέου παστερίωση οποιουδήποτε θετικού δείγματος. Εάν η ενεργότητα της ALP του επαναπαστεριωμένου δείγματος δεν μειώνεται αισθητά, μπορεί να συναχθεί ότι το αρχικό αποτέλεσμα της ανάλυσης ALP οφείλεται στην παρουσία θερμοανθεκτικής

μικροβιακής αλκαλικής φωσφατάσης. Ωστόσο, οι τρέχουσες πρακτικές που χρησιμοποιούνται για τη διάκριση μεταξύ τέτοιων δραστηριοτήτων βασίζονται στη χαρακτηριστική ατομική θερμοκρασία αδρανοποίησης της επανενεργοποιημένης και της μικροβιακής ALP.

Ορισμένες χρωματομετρικές μέθοδοι έχουν σημαντικά μειωμένη ευαισθησία και έχει αποδειχθεί ότι υπάρχει σημαντική αποτυχία ακόμη και 0,8% σε πρόσθετα επίπεδα νωπού γάλακτος. Οι Williams and Nottingham, (1990) τροποποίησαν το πρωτόκολλο ανάλυσης των Aschaffenburg & Mullen αυξάνοντας τον όγκο του δείγματος, με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου για εφαρμογή στο κατσικίσιο γάλα. Οι Klotz et al.,(2008) προσδιόρισαν και σύγκριναν τις δοκιμασίες συμπεριλαμβανομένων των χρωματομετρικών και φθορισμομετρικών προσδιορισμών για τη δραστηριότητα της ALP στο γάλα των αιγοπροβάτων για τη διερεύνηση της καταλληλότητας από τα ισχύοντα πρότυπα της ALP. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η φθορισμομετρική ανάλυση ήταν πιο ευαίσθητη σε σύγκριση με τη χρωματομετρική ανάλυση για τη δραστηριότητα της ALP στα αιγοπρόβατα. Αντιθέτως σε άλλες μελέτες που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της AFFSA, στο Παρίσι, διαπιστώθηκε πως η μέθοδος Charm έδωσε 50% υψηλότερα και ακριβέστερα αποτελέσματα σχετικά με τη μέθοδο Fluorophos(Harding,2007). Μια μελέτη που διεξήχθη από τη Διεθνή Ομοσπονδία Γαλακτοκομίας και τον Διεθνή Οργανισμό Τυποποίησης για την αξιολόγηση της ικανότητας μιας μεθόδου χημειοφωταύγειας για την ALP στα 50,100,350 και 500mU / ml σε ολόκληρο το γάλα πολλαπλών ειδών, έλαβαν μέρος δεκαπέντε εργαστήρια από 8 χώρες και αξιολόγησαν αγελαδινό, κατσικίσιο, πρόβειο, βουβαλίσιο και αποβουτυρωμένο γάλα βοοειδών • 20% λιπαρή κρέμα και 2% λιπαρά για σοκολατούχο γάλα. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης αποκάλυψαν ότι η μέθοδος ήταν συγκρίσιμη με τις φθορισμομετρικές αναλύσεις στην απόδοση, δείχνοντας ότι η μέθοδος της χημειοφωταύγειας είναι κατάλληλη για μέτρηση της ALP στο γάλα πολλαπλών ειδών και σε γαλακτοκομικά προϊόντα σε επίπεδα ΗΠΑ και ΕΕ <350mU /ml (Salter and Fitchen,2006).

Η αλκαλική φωσφατάση του μη αγελαδινού γάλακτος απαιτεί πρόσθετο έλεγχο. Πολλά από τα δεδομένα που αναφέρονται σε μη αγελαδινό γάλα δεν έχουν ακόμη διερευνηθεί διεξοδικά (Rankin et al.,2010).

1.8 Σκοπός εργασίας

Η δοκιμή της αλκαλικής φωσφατάσης αποτελεί μια γρήγορη δοκιμή ελέγχου της επιτυχούς παστερίωσης του αγελαδινού γάλακτος. Όμως, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω αυτή η δοκιμή χρησιμοποιείται και σε μη αγελαδινά γάλατα χωρίς να υπάρχουν επαρκή δεδομένα για την καταλληλότητά της. Η παρούσα μελέτη έχει ως στόχο την ανάπτυξη υλικών αναφοράς αλκαλικής φωσφατάσης γάλακτος (milk alkaline phosphatase standard materials) για διάφορα είδη γάλακτος (αγελαδινό, αίγαιο, πρόβειο, βουβαλίσιο, ονόγαλα και γάλα καμήλας), προκειμένου να ισχυροποιηθεί η πραγματική αξία της δοκιμής της αλκαλικής φωσφατάσης για τον έλεγχο της παστερίωσης του γάλακτος, κάτι που αποτελεί σημαντικό ζήτημα ασφάλειας για τον καταναλωτή.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1 Δειγματοληψία

Συλλέχθηκαν έξι (6) δείγματα μη παστεριωμένου γάλακτος, αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο και βουβαλίσιο από ελληνικές φάρμες, ονόγαλα και γάλα καμήλας από φάρμες της Κύπρου. Τα δείγματα παρελήφθησαν στο εργαστήριο σε κουτιά-ψυγεία πλήρως κατεψυγμένα. Η συντήρησή τους συνεχίστηκε σε θερμοκρασίες κατάψυξης (-18°C) μέχρι και την ανάλυσή τους.

2.2 Αντιδραστήρια αναλύσεων

Στον **πίνακα 2**, παρουσιάζονται τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα στάδια του πειράματος και των αναλύσεων.

Πίνακας 2. Αντιδραστήρια αναλύσεων	
Αντιδραστήρια	
DI Water	p-nitrophenyl phosphate disodium salt (99 % purity) (TCI)
n-Butanol (Chem-Lab)	Αντιδραστήριο Folin Ciocalteu (Chem-Lab)
Acetone (PanReac AppliChem)	BSA
Tris HCl (Alfa Aesar)	NaOH, Na ₂ CO ₃ , CuSO ₄ ·5H ₂ O, ένυδρο τρυγικό Na



Εικόνες 3 & 4. Αντιδραστήρια αναλύσεων (φωτ. αργείου)

2.3 Επεξεργασία δειγμάτων

Στην παρούσα μελέτη, η αλκαλική φωσφατάση εκχυλίστηκε και καθαρίστηκε μέχρι ομοιογένειας χρησιμοποιώντας μια προσέγγιση τριών σταδίων που περιλαμβάνει την εκχύλιση κρέμας, την επεξεργασία με βουτανόλη και την καθίζηση ακετόνης. Η δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε σε κάθε στάδιο καθαρισμού.

Αναλυτικά:

- **Βήμα 1: Εκχύλιση κρέμας**

300 ml μη παστεριωμένου γάλακτος από κάθε δείγμα επιμερίστηκαν σε τρία (3) ισόποσα δείγματα των 100 ml (τρεις επαναλήψεις, n=3) και αραιώθηκαν εξίσου με νερό (100 ml DI H₂O για κάθε 100 ml δείγματος). Τα αραιωμένα δείγματα τοποθετήθηκαν σε φυγοκεντρικούς σωλήνες τύπου falcon των 50 ml. Έπειτα, θερμάνθηκαν στους 37 ° C σε υδατόλουτρο για 30 λεπτά. Το θερμαινόμενο γάλα στη συνέχεια φυγοκεντρήθηκε στις 4000 στροφές, για 10 λεπτά στους 37 ° C για το διαχωρισμό της κρέμας και του αποβουτυρωμένου γάλακτος. Η διαχωρισμένη κρέμα λήφθηκε με σπάτουλα και στη συνέχεια πλύθηκε 2 φορές με νερό DI και φυγοκεντρήθηκε δύο φορές, στις ίδιες συνθήκες. Η πλέον καθαρισμένη κρέμα ζυγίστηκε και εναιωρήθηκε σε DI νερό για να ληφθεί ένα διάλυμα κρέμας 25% (w/v). Για κάθε δείγμα λήφθηκε 1 ml εναιωρήματος για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου.

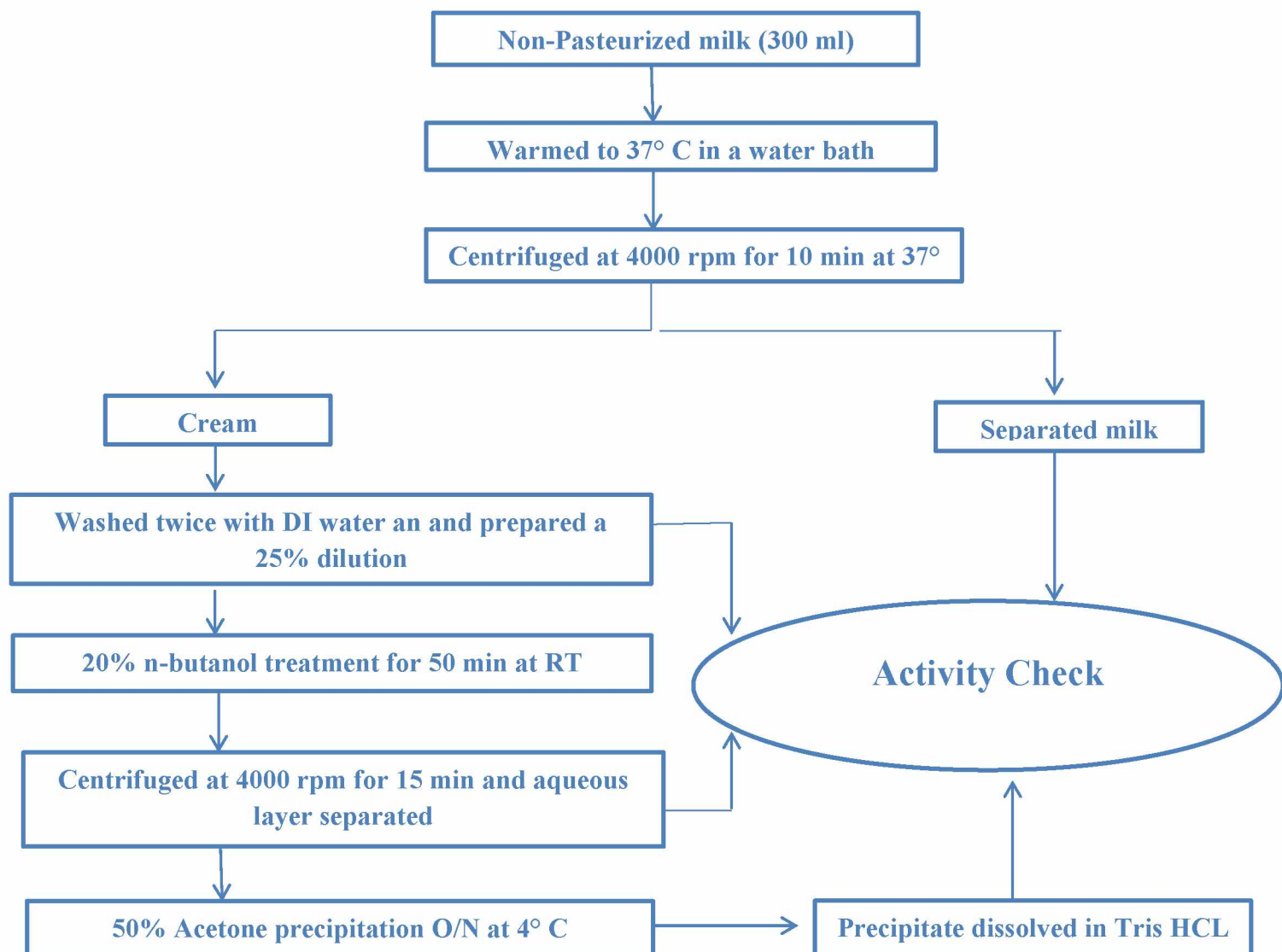
- **Βήμα 2: Επεξεργασία με βουτανόλη**

Στη συνέχεια, το διάλυμα κρέμας κατεργάστηκε με n-βουτανόλη (20% v/v) σε αναλογία 2/1 για 50 λεπτά, με συνεχή ανάδευση σε μαγνητικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία δωματίου. Η υδατική φάση στη συνέχεια διαχωρίστηκε με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 15 λεπτά στους 4 ° C. Παρομοίως με το βήμα 1 λήφθηκε 1 ml υδατικής φάσης από κάθε δείγμα για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου.

- **Βήμα 3: Καταβύθιση ακετόνης**

Η υδατική φάση των δειγμάτων που ελήφθη μετά την κατεργασία με βουτανόλη, τελικά κατεργάστηκε με ψυχρή ακετόνη σε τελικό όγκο 50% (v / v)(1/1), υπό συνεχή ανάδευση και αφέθηκε όλη τη νύκτα (O/N) στους 4 ° C. Την επόμενη

ημέρα, το προκύπτον ίζημα από κάθε δείγμα συλλέχθηκε με φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 λεπτά, και διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCl (0,5 M, pH 9).



Σχήμα 1. Σχηματική παράσταση εκχύλισης και καθαρισμού του ενζύμου

2.4 Δοκιμασία δραστηριότητας ALP

Μετά το πέρας της προαναφερθείσας διαδικασίας (εκχύλιση και καθαρισμός ενζύμου) πραγματοποιήθηκε η δοκιμασία της δραστηριότητας του ενζύμου. Το προκύπτον ίζημα για κάθε 100 ml αρχικού δείγματος διαλύθηκε με το ρυθμιστικό

διάλυμα Tris HCl (0,5 M, pH=9) σε τελικό όγκο 10 ml. Η δοκιμασία της αλκαλικής φωσφατάσης πραγματοποιήθηκε μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες σε όγκο αντίδρασης 1 ml, που περιείχε 400 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Tris HCl (0,5 M), 300 μ L φωσφορικού ρ -νιτροφαινυλίου (PNPP, 5 mM) ως υπόστρωμα και 300 μ L ενζύμου. Έπειτα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν σε κλίβανο για 30 min στους 37° C. Η κίτρινη χρωματισμένη ρ -νιτροφαινόλη που παράχθηκε μετά από την επώαση αναδεύτηκε σε συσκευή vortex και μετρήθηκε φασματοφωτομετρικά στα 405 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδες/ορατό (LLG-uniSPEC 2,UV/VIS). Για κάθε ανάλυση, ελήφθησαν τρεις μετρήσεις και ο μέσος όρος χρησιμοποιήθηκε ως τελική ανάγνωση.



Εικόνα 5. Η κίτρινη χρωματισμένη ρ -νιτροφαινόλη που παράχθηκε μετά από την επώαση. (φωτ. αρχείου)



Εικόνα 6. Φασματοφωτόμετρο υπεριώδες/ορατό (LLG-uniSPEC 2,UV/VIS) (φωτ. αρχείου)

2.5 Εκτίμηση ολικής ALP

Ο προσδιορισμός της ολικής ALP πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο Lowry (Lowry et al., 1951) χρησιμοποιώντας μια τυπική καμπύλη πρωτεΐνης ορού αλβουμίνης βοοειδών (BSA) (mg / ml). Οι μετρήσεις ελήφθησαν φασματοφωτομετρικά στα 750 nm σε φασματοφωτόμετρο υπεριώδες/ορατό (LLG-uniSPEC 2 ,UV/VIS).

Αναλυτικά:

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα (A,B,C) τα οποία αναμείχθηκαν σε αναλογία 10:0,1:0,1 προς δημιουργία ενός τελικού διαλύματος (D).

A. NaOH με Na ₂ CO ₃	500 ml
B. CuSO ₄ ·5(H ₂ O)	100 ml
C. Na ₂ Tartrate	100 ml

Έπειτα, μέσα σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν 0,5 μL δείγματος και 0,7 μL του διαλύματος D. Αναδεύτηκαν σε συσκευή vortex και αφέθηκαν σε σκοτεινό μέρος, σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 0,1 μL του αντιδραστηρίου Folin Ciocalteu, αναδεύτηκαν σε συσκευή vortex και αφέθηκαν πάλι στις ίδιες συνθήκες για 30 λεπτά επιπλέον. Μετά το πέρας των 30 λεπτών επαναλήφθηκε η ανάδευση σε συσκευή vortex και μετρήθηκε η συγκέντρωση της ολικής ALP φασματοφωτομετρικά στα 750 nm. Παρομοίως για κάθε ανάλυση, ελήφθησαν τρεις μετρήσεις και ο μέσος όρος χρησιμοποιήθηκε ως τελική ανάγνωση.

3. Αποτελέσματα- Συζήτηση

Για την ανάλυση της δραστηριότητας της ALP σε μη παστεριωμένα γάλατα διαφόρων ειδών χρησιμοποιήθηκε μια προσέγγιση τριών σταδίων για τον καθαρισμό του ενζύμου. Στο πρώτο βήμα, η κρέμα εκχυλίστηκε από το νοπό γάλα που περιείχε το μεγαλύτερο μέρος του ενζύμου με τη μορφή συμπλόκου λιποπρωτεϊνών (Albillos et al., 2011). Στη συνέχεια υποβλήθηκε σε επεξεργασία με η-βουτανόλη, η οποία είναι ο μόνος διαλύτης που αναφέρεται ότι είναι αποτελεσματικός για την απομάκρυνση του λιπιδίου από το σύμπλεγμα λιποπρωτεϊνών και έτσι απελευθερώθηκε ένζυμο στο διάλυμα (Morton, 1953a). Έπειτα, αυτό το υδατικό διάλυμα που περιείχε το ένζυμο υποβλήθηκε σε επεξεργασία με ψυχρή ακετόνη σε συγκέντρωση 50% (O/N) για όλη τη νύχτα για να καταβυθιστεί το ένζυμο/πρωτεΐνη. Το ίζημα συλλέχθηκε με φυγοκέντρωση στις 4.000 rpm για 15 λεπτά, και διαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCl (0,5 M, pH 9) για να ληφθεί το καθαρισμένο διάλυμα αλκαλικής φωσφατάσης.

Στους πίνακες 1,2,3,4,5 & 6 που ακολουθούν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της δραστηριότητας ALP και της ολικής ALP στα διαφορετικά στάδια καθαρισμού του ενζύμου.

Πίνακας 1. Αποτελέσματα δραστηριότητας και ολικής ALP			
ΑΓΕΛΛΑΙΝΟ	Όγκος (ml)	Δραστηριότητα ALP (Abs)	Ολική ALP (mg/ml)
Ολική ποσότητα γάλακτος	300	3,968	709,46
Διαχωρισμένη κρέμα (25% w/v)	75	1,135	203,12
Επεξεργασία με βουτανόλη	144	0,906	65,85
Επεξεργασία με ακετόνη	130	1,928	440,49

Πίνακας 2. Αποτελέσματα δραστηριότητας και ολικής ALP			
ΒΟΥΒΑΛΙΣΙΟ	Όγκος (ml)	Δραστηριότητα ALP (Abs)	Ολική ALP (mg/ml)
Ολική ποσότητα γάλακτος	300	3,917	441,08
Διαχωρισμένη κρέμα (25% w/v)	117,5	0,236	82,52
Επεξεργασία με βουτανόλη	253	0,534	42,52
Επεξεργασία με ακετόνη	248	3,146	316,05

Πίνακας 3. Αποτελέσματα δραστηριότητας και ολικής ALP			
ΓΙΔΙΝΟ	Όγκος (ml)	Δραστηριότητα ALP (Abs)	Ολική ALP (mg/ml)
Ολική ποσότητα γάλακτος	300	1,974	711,99
Διαχωρισμένη κρέμα (25% w/v)	30,5	1,700	422,21
Επεξεργασία με βουτανόλη	48,6	0,023	51,40
Επεξεργασία με ακετόνη	41	0,251	238,37

Πίνακας 4. Αποτελέσματα δραστηριότητας και ολικής ALP			
ΠΡΟΒΕΙΟ	Όγκος (ml)	Δραστηριότητα ALP (Abs)	Ολική ALP (mg/ml)
Ολική ποσότητα γάλακτος	300	7,134	522,29
Διαχωρισμένη κρέμα (25% w/v)	39	3,333	285,65
Επεξεργασία με βουτανόλη	78	0,794	46,56
Επεξεργασία με ακετόνη	70	3,007	190,09

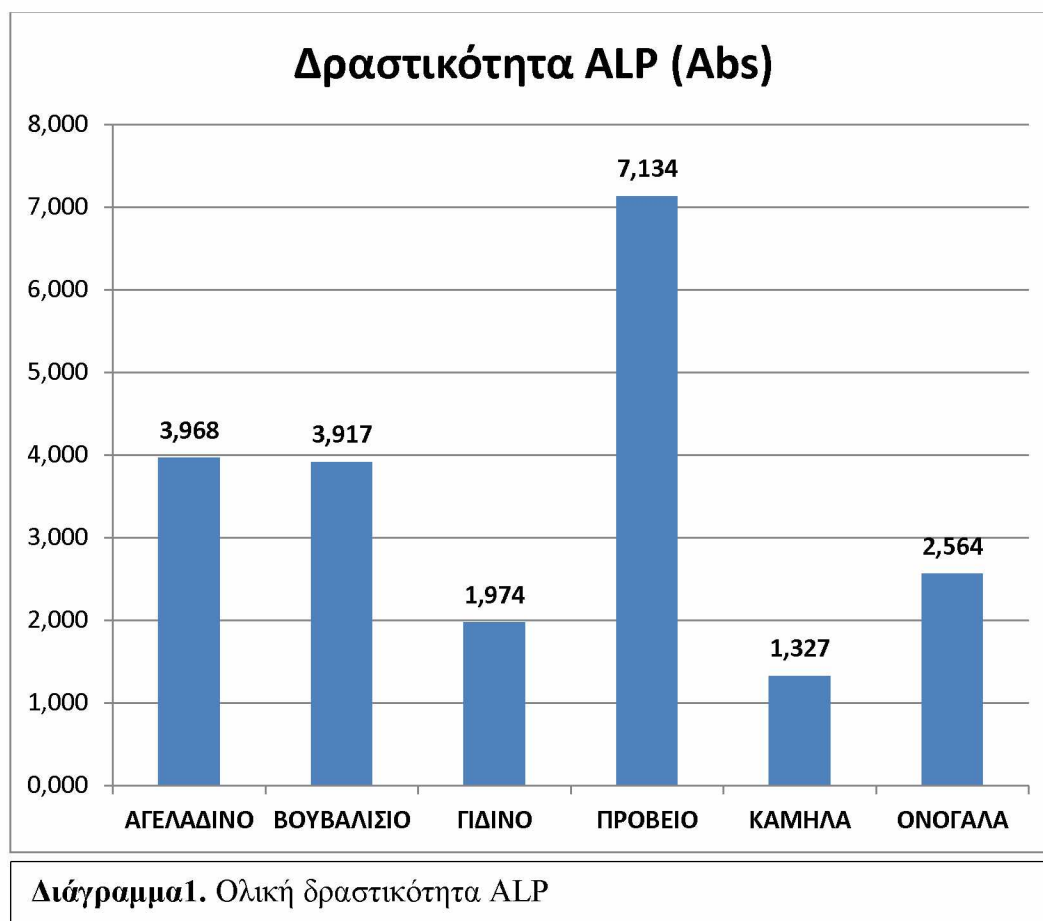
Πίνακας 5. Αποτελέσματα δραστηριότητας και ολικής ALP			
ΓΑΛΛΑ ΚΑΜΗΛΑΣ	Όγκος (ml)	Δραστηριότητα ALP (Abs)	Ολική ALP (mg)
Ολική ποσότητα γάλακτος	300	1,327	612,80
Διαχωρισμένη κρέμα (25% w/v)	21	0,870	349,08
Επεξεργασία με βουτανόλη	40	0	58,07
Επεξεργασία με ακετόνη	38	0,456	205,65

Πίνακας 6. Αποτελέσματα δραστηριότητας και ολικής ALP			
ΟΝΟΓΑΛΛΑ	Όγκος (ml)	Δραστηριότητα ALP (Abs)	Ολική ALP (mg/ml)
Ολική ποσότητα γάλακτος	300	2,564	660,99
Επεξεργασία με βουτανόλη	300	0,373	127,16
Επεξεργασία με ακετόνη	550	2,191	533,83

Σύμφωνα με τα επιμέρους αποτελέσματα, στο αγελαδινό, στο βουβαλίσιο και στο πρόβειο γάλα η υψηλότερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε στην κρέμα (επεξεργασία με ακετόνη) και η χαμηλότερη δραστηριότητα στο στάδιο της επεξεργασίας με βουτανόλη. Έχει αναφερθεί ότι η ALP στο αγελαδινό γάλα σχετίζεται με τη μεμβράνη των σφαιριδίων του λίπους γάλακτος, και αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ALP να συγκεντρώνεται στη φάση της κρέμας (Kosikowski, 1988). Επιπλέον, οι Sharma and Ganguli (1974) και οι Lombardi et al.,(2000) ανέφεραν το ίδιο και για το βουβαλίσιο γάλα. Αντιθέτως, στο γίδινο, στο γάλα καμήλας η υψηλότερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε στο εναιώρημα. Επίσης, η υψηλότερη συγκέντρωση ALP παρατηρήθηκε αναλόγως στην κρέμα.

Δραστικότητα ALP

Στο **διάγραμμα 1**, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την ολική δραστικότητα της ALP σε κάθε δείγμα.



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στο διάγραμμα, η υψηλότερη δραστικότητα παρατηρήθηκε στο πρόβειο γάλα και η χαμηλότερη στο γάλα καμήλας. Συγκριτικά με το αγελαδινό, η δραστικότητα ALP στο βουβαλίσιο γάλα δεν έχει σημαντική διαφορά ενώ στο πρόβειο η δραστικότητα είναι περίπου δύο φορές υψηλότερη και στο γίδινο δύο φορές χαμηλότερη. Οι τιμές στο γάλα καμήλας και στο ονόγαλα είναι επίσης σημαντικά χαμηλότερες, σε σύγκριση με το αγελαδινό. Αξίζει να σημειωθεί, ότι τα παρόντα αποτελέσματα δεν διαφέρουν σημαντικά, συγκρίνοντάς τα με αποτελέσματα από άλλες μελέτες που υπάρχουν στη βιβλιογραφία. Συγκεκριμένα, έχει βρεθεί ότι η δραστικότητα της ALP στο νοπό πρόβειο γάλα φαίνεται να είναι περίπου τρεις φορές υψηλότερη και στο αιγοπρόβειο γάλα περίπου πέντε φορές χαμηλότερη από ό,τι στο αγελαδινό γάλα και είναι πολύ

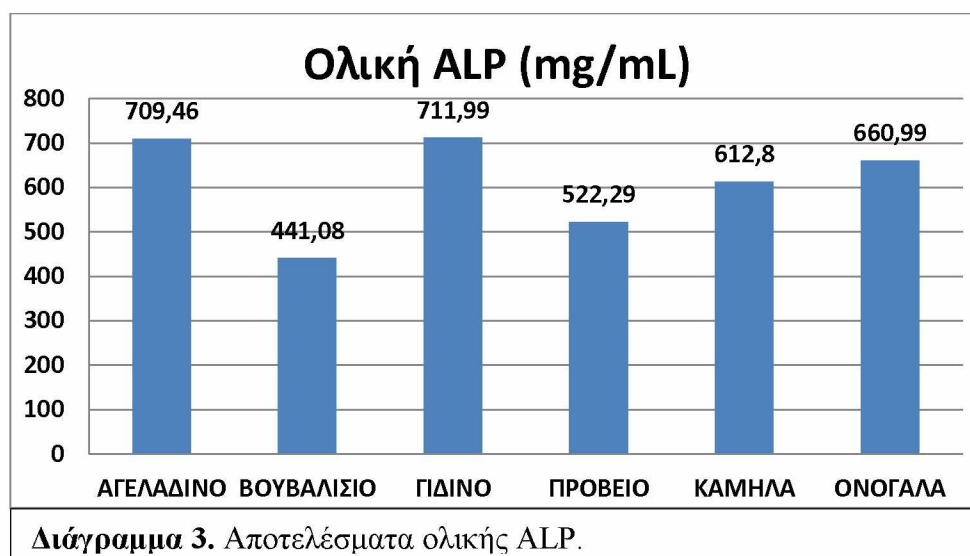
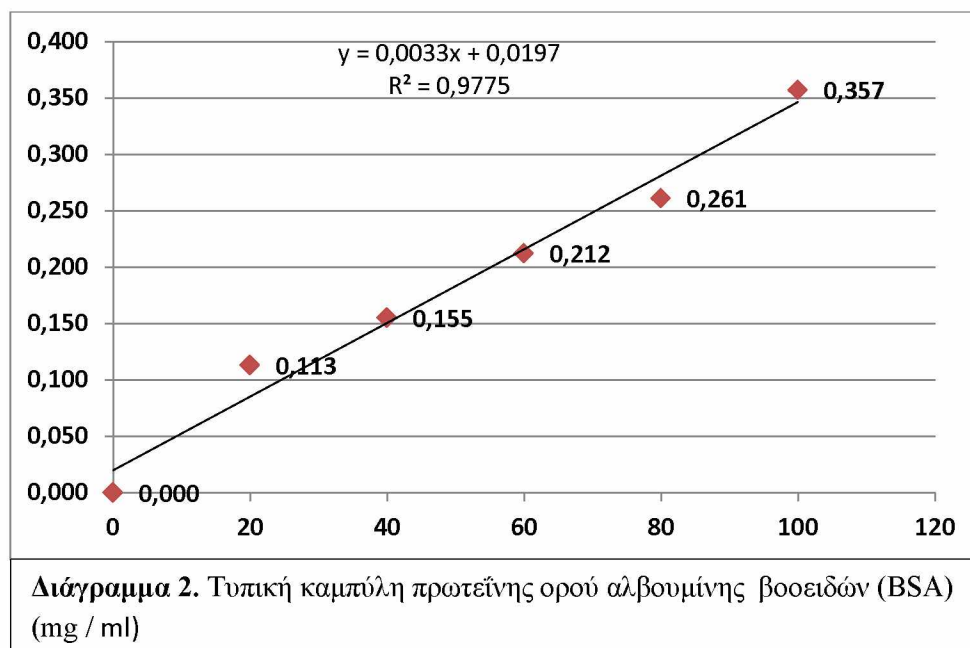
μεταβλητή μεταξύ των φυλών (Assis et al., 2000, Vamvakaki et al.2006, Klotz et al.,2008 και Lorenzen et al.,2010). Επίσης, οι Sharma et al.,(2009) ανέφεραν ότι η δραστηριότητα του ενζύμου ALP στο κατσικίσιο γάλα ήταν σημαντικά χαμηλότερη από ό, τι στο αγελαδινό ή στο βουβαλίσιο γάλα. Επιπλέον, για το βουβαλίσιο γάλα έχει αναφερθεί ότι η δραστηριότητα της ALP είναι γενικά ελαφρώς μικρότερη σε σχέση με το αγελαδινό γάλα (Sharma and Ganguli, 1974) .Οι Marchand et al.,(2009) έδειξαν ότι στο νωπό γάλα των ιπποειδών και κατ' επέκταση στο ονόγαλα, η δραστηριότητα της ALP σε σύγκριση με το αγελαδινό γάλα ήταν πολύ χαμηλότερη. Αναλόγως, οι Lorenzen et al.,(2010) σε μία από τις έρευνες τους, έδειξαν ότι το γάλα καμήλας έχει πολύ χαμηλή δραστηριότητα.

Ερμηνεύοντας τα αποτελέσματα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι τα είδη γάλακτος με υψηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος (πρόβειο, αγελαδινό και βουβαλίσιο) εμφανίζουν και υψηλότερη δραστηριότητα ALP, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα τρία είδη γάλακτος (γίδινο, γάλα καμήλας και ονόγαλα) που έχουν χαμηλότερη περιεκτικότητα σε λίπος. Αυτό σημαίνει ότι η δραστηριότητα της ALP έχει θετική συσχέτιση με τα επίπεδα λίπους στο γάλα.

Οι Painter και Bradley (1997) απέδειξαν ότι προϊόντα με αυξημένα επίπεδα λίπους μπορούν να έχουν υψηλότερες τιμές ALP και κατ' επέκταση αναφέρεται ότι το νωπό αποβουτυρωμένο γάλα έχει πολύ χαμηλότερη δραστηριότητα ALP. Η περιεκτικότητα σε λίπος έχει επίσης αποδειχθεί ότι συσχετίζεται θετικά με τα επίπεδα ALP στο πρόβειο γάλα (Anifantakis and Rosakis, 1983, IZSLT, 2020), καθώς και στο νωπό αγελαδινό γάλα, περίπου το 40% της δραστηριότητας ALP σχετίζεται με το κλάσμα λίπους (Painter and Bradley, 1997, Marchand et al.,2009).Επιπλέον, σύμφωνα με τους Marchand et al.,(2009) στην περίπτωση του γάλακτος των ιπποειδών δεν υπάρχει συγκεκριμένη συσχέτιση της ALP με το κλάσμα λίπους ή τη σφαιρική μεμβράνη του λίπους του γάλακτος. Επίσης, η δραστηριότητα ALP στο κατσικίσιο γάλα έχει αναφερθεί ότι ποικίλλει ευρέως με λίγη ή καθόλου συσχέτιση με το λίπος του γάλακτος (Williams and Nottingham, 1990).Ωστόσο, αναφέρεται ότι η δραστηριότητα της ALP δεν επηρεάζεται μόνο από τα επίπεδα λίπους αλλά και από το στάδιο γαλουχίας και τις εποχικές διακυμάνσεις.

Εκτίμηση ολικής ALP

Στα **διάγραμμα 2**, απεικονίζεται η τυπική καμπύλη πρωτεΐνης ορού αλβουμίνης βοοειδών (BSA) (mg / ml) με την οποία υπολογίστηκε η συγκέντρωση της ολικής ALP και στο **διάγραμμα 3**, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ολικής ALP για κάθε δείγμα.



Σύμφωνα με τα αποτελέσματα η υψηλότερη συγκέντρωση ολικής ALP παρατηρήθηκε στο γίδινο γάλα και η χαμηλότερη στο βουβαλίσιο γάλα. Σε σύγκριση με το αγελαδινό, η ALP στο γίδινο είναι ελαφρώς υψηλότερη, ενώ στο βουβαλίσιο γάλα είναι περίπου δύο φορές χαμηλότερη. Σημαντικά χαμηλότερες τιμές

παρατηρήθηκαν στο πρόβειο γάλα, στο γάλα καμήλας και στο ονόγαλα, σε σύγκριση με το αγελαδινό.

Σύγκριση διαγραμμάτων δραστικότητας ALP και ολικής ALP

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από τα **διαγράμματα 1 & 3** αυτό που παρατηρείται είναι ότι η δραστικότητα της ALP δεν είναι ανάλογη με την συγκέντρωση της ολικής ALP. Δηλαδή, ενώ το πρόβειο γάλα φαίνεται να έχει την υψηλότερη δραστικότητα ALP, έχει ταυτόχρονα πολύ χαμηλή συγκέντρωση ολικής ALP σε αντίθεση με το γίδινο που ενώ έχει πολύ χαμηλή δραστικότητα ALP, ταυτόχρονα έχει την υψηλότερη συγκέντρωση σε ολική ALP. Σε γενικές γραμμές μπορούμε να πούμε ότι, ενώ η υψηλότερη δραστικότητα ALP παρατηρήθηκε στους τύπους γάλακτος με υψηλά επίπεδα λίπους, η υψηλότερη συγκέντρωση της ολικής ALP αντίθετα παρατηρήθηκε στους τύπους γάλακτος με χαμηλά επίπεδα λίπους.

4. Συμπεράσματα

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης μπορούμε να συμπεράνουμε τα εξής:

- ❖ Το πρόβειο γάλα έχει την υψηλότερη δραστικότητα και το γάλα καμήλας τη χαμηλότερη, σε σύγκριση με το αγελαδινό.
- ❖ Η δραστικότητα της ALP δείχνει να έχει θετική συσχέτιση με τα επίπεδα λίπους, δεδομένου ότι ήταν υψηλότερη στα είδη γάλακτος με υψηλά επίπεδα λίπους (πρόβειο, αγελαδινό, βουβαλίσιο).
- ❖ Το γίδινο γάλα έχει τη μεγαλύτερη συγκέντρωση σε ολική ALP και το βουβαλίσιο τη μικρότερη σε σύγκριση με το αγελαδινό.
- ❖ Η ολική συγκέντρωση της ALP δεν είναι ανάλογη της δραστικότητας.

Εν κατακλείδι, χρειάζεται να γίνουν και άλλες μελέτες σε μη αγελαδινά γάλατα για τη διερεύνηση της δραστικότητας της ALP και τους παράγοντες που μπορεί να την επηρεάζουν, προκειμένου να υπάρξουν περισσότερα δεδομένα που θα οδηγήσουν σε πιο σαφή συμπεράσματα, για τον προσδιορισμό των ορίων μιας πιο ασφαλούς παστερίωσης.

Βιβλιογραφία

Κώδικας Τροφίμων και Ποτών (2003), Άρθρο 7. Π.Δ. 56/21-2-1995 «Συμμόρφωση της Ελληνικής νομοθεσίας προς τις Οδηγίες 92/46/ΕΟΚ και 92/47/ΕΟΚ του Συμβουλίου περί των υγειονομικών κανόνων που διέπουν την παραγωγή και εμπορία γάλακτος και προϊόντων με βάση το γάλα» (ΦΕΚ 45/27-2-95 τ. Α).

Abd El-Salam, M. H., & El-Shibiny, S.,(2011). A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. *Dairy Science & Technology*, 91, 663-699.

Albillos, S. M., Reddy, R., & Salter, R. (2011). Evaluation of alkaline phosphatase detection in dairy products using a modified rapid chemiluminescent method and official methods. *Journal of food protection*, 74(7), 1144-1154.

Ali F, Hussain R, Qayyum A, Gul ST, Iqbal Z and Hassan MF,(2016). Milk somatic cell counts and some hemato-biochemical changes in sub-clinical mastitic dromedary She-Camels (*Camelus dromedarius*). *Pakistan Veterinary Journal*, 36, 405–408.

Aschaffenburg R, JEC Mullen,(1949). A rapid and simple phosphatase test for milk *J Dairy Res* 16(1): 58-67.

Assis G, De Bivar Roseiro ML and Barbosa M, (2000). Determination of alkaline phosphatase activity in milk from indigenous Portuguese ewe and goat breeds by the fluorometric method. *International Dairy Federation Bulletin*, 351, 33.

Anifantakis EM., PS Rosakis (1983). Alkaline phosphatase activity of sheep milk and some factors affecting it. *Egyptian J Dairy Sci* 11:173-182.

Banks J and Muir DD, (2002). Variability of alkaline phosphatase in goat milk in relation to its use as an effective index of pasteurization. 175 pp.

Barbosa M. (2005). Interest in controlling alkaline phosphatase activity in sheep and goat milks. Pp. 117-127.

Berger TM, Maurer J, Schaeren W and Egger L,(2008). Alkaline phosphatase activity in Swiss ewe's and goat's milk.

Black RG, M Kuzyk, J Duggan, (1993). Evaluation of a fluorometric assay for alkaline phosphatase in fluid dairy products. *Aust J Dairy Technol* 47: 164-167.

Bylund G, (1995). *Dairy Processing Handbook*. Tetra Pak Processing Systems AB, 436 pp.

CAC (Codex Alimentarius Commission),(2004). Draft code of hygienic practice for milk and milk products at step 8, Report of the thirty-sixth session of the codex

committee on food hygiene. Codex Alimentarius Commission Twenty-seventh Session, 2004, 44-82.

Chen, C. C., Y. C. Tai, S. C. Shen, Y. Y. Tu, M. C. Wu, and H. M. Chang,(2006). Detection of alkaline phosphatase by competitive indirect ELISA using immunoglobulin in yolk (IgY) specific against bovine milk alkaline phosphatase. *Food Chem.* 95:213–220.

Claeys WL, AM vanLoey, ME Hendrickz (2002). Kinetics of alkaline phosphatase and lacto peroxidase inactivation, and of β -lacto globulin denaturation in milk with different fat content. *J Dairy Res* 69(4):541-553.

Claeys W.L., C. Verraes, S. Cardoen, J. De Block b, A. Huyghebaert , K. Raes, K. Dewettinck , L. Herman (2014). Consumption of raw or heated milk from different species: An evaluation of the nutritional and potential health benefits. *Food Control* 42:188-201.

Commission Regulation (EC) No. 2074/2005. Official Journal of the European Union. pp. 27-59.

Deeth HC, (2006). Lipoprotein lipase and lipolysis in milk. *International Dairy Journal*, 16, 555–562.

Deeth HC, Datta N and Versteeg C, (2013). Nonthermal Technologies in Dairy Processing. In: Smithers GW, AugustinMA (eds.). *Advances in Dairy Ingredients*, pp. 161–215.

Deeth HC and Lewis MJ, (2017). High temperature processing of milk and milk products. John Wiley and Sons Ltd.574 pp.

Dietschy, J. M., & Turley, S. D. (2004). Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *Journal of Lipid Research*, 45.

Doreau, M., & Martin-Rosset, W. (2002). Dairy animals: horse. In H. Roginsky, J. W. Fuquay, & P. F. Fox (Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 358e365). London, Amsterdam: Academic Press.

Dumitraşcu, L., Stănciuc, N., Stanciu, S., & Râpeanu, G. (2014). Inactivation kinetics of alkaline phosphatase from different species of milk using quinoly phosphate as a substrate. *Food Science and Biotechnology*, 23(6), 1773-1778.

Eberhard P and Gallmann P, (1994). Konsummilchsorten. *Agrarforschung Schweiz*, 1, 456–459.

Eckner, K. F. (1992). Fluorometric analysis of alkaline phosphatase inactivation correlated to Salmonella and Listeria inactivation. *Journal of food protection*, 55(12), 960-963.

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), (2015). Scientific opinion on the public health risks related to the consumption of raw drinking milk. *EFSA Journal*, 13(1), 3940.

European Food Safety Authority (EFSA), Clawin-Rädecker, I., De Block, J., Egger, L., Willis, C., Da Silva Felicio, M. T., & Messens, W. (2021). The use of alkaline phosphatase and possible alternative testing to verify pasteurization of raw milk, colostrum, dairy and colostrum-based products. *EFSA Journal*, 19(4).

Farah, Z., Rettenmaier, R., & Atkins, D. (1992). Vitamin content of camel milk. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*, 62.

Faye, B., & Konuspayeva, G. (2012). The sustainability challenge to the dairy sector the growing importance of non-cattle milk production worldwide. *International Dairy Journal*, 24, 50-56.

Fenoll, J., Jourquin, G., & Kauffmann, J. M., (2002). Fluorimetric determination of alkaline phosphatase in solid and fluid dairy products. *Talanta*, 56(6), 1021-1026.

Fernley, H. N., & Walker, P. G., (1965). Kinetic behaviour of calf-intestinal alkaline phosphatase with 4-methylumbelliferyl phosphate. *Biochemical Journal*, 97(1), 95-103.

Fox, P. F., & Kelly, A. L., (2006). Indigenous enzymes in milk: Overview and historical aspects—Part 2. *International Dairy Journal*, 16(6), 517-532.

Gastaldi, D., Bertino, E., Monti, G., Baro, C., Fabris, C., Lezo, A., et al. (2010). Donkey's milk detailed lipid composition. *Frontiers in Bioscience*, E2.

Gerosa, S., & Skoet, J. (2012). Milk availability e Trends in production and demand and medium-term outlook. Rome (Italy): FAO, United Nations.

Girotti, S., Ferri, E., Ghini, S., Budini, R., & Roda, A., (1994). Chemiluminescent assay of alkaline phosphatase in milk. *Nederlands melk en Zuiveltijdschrift*, 48(4), 213-224.

Harding F., (1991). Alkaline phosphatase test as a measure of correct pasteurization. *Bullet in 262 Int Dairy Fed*, Brussels, Belgium.

Harding F.,(2007). E.U. Adopts a new reference for pasteurization. *Food and Beverage International* 05 December 2007. Bath, UK: Zenith International Publishings.

Hilal A P. (2018). Validation of milk product pasteurization by Alkaline Phosphatase Activity. *Con Dai & Vet Sci* 1(3).

IZSLT (Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana“M. Aleandri”), (2020). Sintesi – Attività della fosfatasi alcalina nel latte di pecora, capra e bufala in relazione al trattamento termico di pastorizzazione: studio sperimentale per un limite di conformità.

Jainudeen, M. R. (2002). Buffalo husbandry. In H. Roginsky, J. W. Fuquay, & P. F. Fox(Eds.), *Encyclopedia of dairy sciences* (pp. 186-193). London, Amsterdam: Academic Press.

Jensen, R., Ferris, A., Lammi-Keefe, C., & Henderson, R.,(1990). Lipids of bovine and human milks : a comparison. *Journal of Dairy Science*, 73.

Junior AB, GuimarAes LHS, Terenzi HF et al.,(2008). Purification and biochemical characterization of thermostable alkaline phosphatases produced by *Rhizopus microsporus rhizopodiformis*. *Folia Microbiol (Praha)* 53:509–516.

Katsoulos PD, Christodouloupoulos G, Minas A, Karatzia MA, Pourliotis K and Kritas SK, (2010). The role of lactate dehydrogenase, alkaline phosphatase and aspartate aminotransferase in the diagnosis of subclinical intramammary infections in dairy sheep and goats. *Journal of Dairy Research*, 77, 107–111.

Kay, H. D., and W. R. Graham, Jr.,(1935). The phosphatase test for pasteurized milk. *J. Dairy Res.* 6:191–203.

Klotz V, A Hill, K. Warriner, M. Griffiths, J. Odumerou (2008). Assessment of the colorimetric and fluorometric assays for alkaline phosphatase activities in cow’ s, goat’ s and sheep’ s milk. *J Food Prot.* 71:1884-1888.

Knight, A. H., & Fryer, S. M. (1989). The development of heat-resistant phosphatase activity in raw milk. *International Journal of Dairy Technology*, 42(3), 81-86.

Kosikowski FV (1988). Enzyme behavior and utilization in dairy technology. *J Dairy Sci* 71(3):557-573.

Kricka, L. J. (2003). Clinical applications of chemiluminescence. *Analytica chimica acta*, 500(1-2), 279-286.

Kunz, C., & Rudloff, S. (2006). Health promoting aspects of milk oligosaccharides. *International Dairy Journal*, 16.

Kuzuya Y, Kanamaru Y and Tanahashi T,(1982). Purification of bovine milk alkaline phosphatase with affinity chromatography and effect of flavonoids and saccharides on the enzyme activities. *Nihon Chikusan Gakkaiho*,53, 45–49.

- Lakra, S., Jadhav, V. J., & Garg, S. R.,(2016).** Development of a chromatographic method for the determination of alkaline phosphatase activity in pasteurized milk. *Food Analytical Methods*, 9(7), 2002-2009.
- Levieux, D., N. Geneix, and A. Levieux,(2007).** Inactivation-denaturation kinetics of bovine milk alkaline phosphatase during mild heating as determined by using a monoclonal antibody-based immunoassay. *J. Dairy Res.* 74:296–301.
- Linden, G., Chappellet-Tordo, D., & Lazdunski, M., (1977).** Milk alkaline phosphatase. Stimulation by Mg²⁺ and properties of the Mg²⁺ site. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology*, 483(1), 100-106.
- Linden, G., & Alais, C., (1979).** Alkaline phosphatase in human, cow and sheep milks: molecular and catalytic properties and metal ion action. In *Annales de biologie animale biochimie biophysique* (Vol. 18, No. 3, pp. 749-758). EDP Sciences.
- Lombardi P., L. Avallone, AD Angelo, TM, E Bogin, (2000).** Buffalo milk enzyme levels, their sensitivity to heat reactivation, and their possible use as markers for pasteurization. *J Food Prot.* 63(7):970-973.
- Lorenzen, P. C., Martin, D., Clawin-Rädecker, I., Barth, K., & Knappstein, K., (2010).** Activities of alkaline phosphatase, γ -glutamyltransferase and lactoperoxidase in cow, sheep and goat's milk in relation to heat treatment. *Small Ruminant Research*, 89(1), 18-23.
- Lorenzen, P. C., Wernery, R., Johnson, B., Jose, S., & Wernery, U.,(2011).** Evaluation of indigenous enzyme activities in raw and pasteurized camel milk. *Small Ruminant Research*, 97(1-3), 79-82.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.,(1951).** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.*(193):265–275.
- Lyster, R. L. J., & Aschaffenburg, R.,(1962).** The reactivation of milk alkaline phosphatase after heat treatment. *Journal of Dairy Research*, 29(1), 21-35.
- Malacarne, M., Martuzzi, F., Summer, A., & Mariani, P. (2002).** Review: protein and fat composition of mare's milk: some nutritional remarks with reference to human and cow's milk. *International Dairy Journal*, 12, 869-877.
- Marchand, S., Merchiers, M., Messens, W., Condijs, K., & De Block, J. (2009).** Thermal inactivation kinetics of alkaline phosphatase in equine milk. *International Dairy Journal*, 19, 763-767.
- Mathur MP (1974).** Studies on alkaline phosphatase in goat milk. *Indian J Dairy Sci* 28: 145-147.
- Micciche, K.,(2005).** Regulation & pasteurization. *Dairy industries international*, 70 (11), 44-45.

- Miggiano GA, Mordente A, Martorana GE, Meucci E and Castelli A, (1983).** In vitro effect of ascorbic acid on bovine kidney alkaline phosphatase activity. *Acta Vitaminologica et Enzymologica*, 5, 153–158.
- Morton R.K., (1953).** Alkaline phosphatase of milk. 2. Purification of the enzyme. *Biochem J.* (55):795–800.
- Murthy, G. K., Cox, S., & Kaylor, L. (1976).** Reactivation of alkaline phosphatase in ultra-high temperature, short-time processed liquid milk products. *Journal of dairy science*, 59(10), 1699-1710.
- Murthy, G. K., & Peeler, J. T. (1979).** Rapid methods for differentiating reactivated from residual phosphatase in milk and cream: Collaborative study. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 62(4), 822-827.
- Narenji Sani R, Hajigolikhani B, Ahmadi-Hamedani M and Kafshdouzan K, (2018).** Diagnostic evaluation of milk lactate dehydrogenase and alkaline phosphatase activities by receiver operating characteristic analysis curve in early lactation of ewes with subclinical mastitis. *Veterinary Research Forum*, 9, 343–348.
- Painter, C. J., & Bradley Jr, R. L.,(1997).** Residual alkaline phosphatase activity in milks subjected to various time-temperature treatments. *Journal of Food Protection*, 60(5), 525-530.
- Park, Y. W., Juárez, M., Ramos, M., & Haenlein, G. F. W.,(2007).** Physico-chemical characteristics of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68.
- Patil MP, Nagvekar AS, Ingole SD, Bharucha SV and Palve VT.,(2015).** Somatic cell count and alkaline phosphatase activity in milk for evaluation of mastitis in buffalo. *Veterinary World*, 8, 363–366.
- Persson Y, Larsen T and Nyman A-K., (2014).** Variation in udder health indicators at different stages of lactation in goats with no udder infection. *Small Ruminant Research*, 116, 51–56.
- Payne, C., & Wilbey, R. A., (2009).** Alkaline phosphatase activity in pasteurized milk: A quantitative comparison of Fluorophos and colourimetric procedures. *International journal of dairy technology*, 62(3), 308-314.
- Potocnik, K., Gantner, V., Kuterovac, K., & Cividini, A.,(2011).** Mare's milk: composition and protein fraction in comparison with different milk species. *Mljekarstvo*, 61.
- Rademacher, B., & Hinrichs, J. (2006).** Effects of high pressure treatment on indigenous enzymes in bovine milk: Reaction kinetics, inactivation and potential application. *International dairy journal*, 16(6), 655-661.

- Rankin, S. A., Christiansen, A., Lee, W., Banavara, D. S., & Lopez-Hernandez, A. (2010).** Invited review: The application of alkaline phosphatase assays for the validation of milk product pasteurization. *Journal of dairy science*, 93(12), 5538-5551.
- Raynal-Ljutovac, K., Park, Y.W., Gaucheron, F., & Bouhallab, S. (2007).** Heat stability and enzymatic modifications of goat and sheep milk. *Small Ruminant Research*, 68, 207-220.
- Richardson, L. A., McFarren, E. F., & Campbell, J. E.,(1964).** Phosphatase reactivation. *Journal of Dairy Science*, 47(2), 205-210.
- Ritota, M., Di Costanzo, M. G., Mattera, M., & Manzi, P. (2017).** New trends for the evaluation of heat treatments of milk. *Journal of analytical methods in chemistry*, 2017.
- Rocco, R. M. (2004).** Chapter 14 Alkaline Phosphatase Methods . In *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. American Public Health Association.
- Salamon, R. V., Salamon, Sz, Csapó-Kiss, Zs, & Csapó, J. (2009).** Composition of mare's colostrums and milk. I. Fat content, fatty acid composition and vitamin contents. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, 2.
- Salter, R. S., & Fitchen, J. (2006).** Evaluation of a Chemiluminescence Method for Measuring Alkaline Phosphatase Activity in Whole Milk of Multiple Species and Bovine Dairy Drinks: Interlaboratory Study. *Journal of AOAC International*, 89(4), 1061-1070.
- Scharer, H. (1938).** A rapid phosphomonoesterase test for control of dairy pasteurization. *Journal of Dairy Science*, 21(1), 21-34.
- Scharer, H. (1943).** Laboratory Control of Milk under War Conditions: The Rapid Phosphatase Test. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 33(4), 396-398.
- Schlimme, E., Kiesner, C., Lorenzen, P. C., & Martin, D., (1997).** Chemical process parameters for thermal inactivation of alkaline phosphatase in milk. *Kieler Milchwirtschaftliche Forschungsberichte*, 49(3), 207-219.
- Shakeel Ur Rehman, Fleming CM, Farkye NY, Fox PF (2003).** Indigenous phosphatases in milk. In. *Advanced Dairy Chemistry*, pp. 523-544.
- Sharma RS, Ganguli N C., (1974).** Purification and properties of reactivated alkaline phosphatase from buffalo milk. *Milchwissenschaft* 29: 79-84.
- Sharma R., Kaur S., Rajput YS., Kumar R. (2009).** Activity and thermal stability of indigenous enzymes in cow, buffalo and goat milk. *Milchwissenschaft* 64(2):173-175.

- Sharma, U., Pal, D., & Prasad, R. (2014).** Alkaline phosphatase: an overview. *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 29(3), 269-278.
- Suzuki U, Yoshimura K, Takaishi M (1907).** Ubereinenzym “phytase” dasanhydro-oxy-methylen-diphosphorsäurespaltet. *Bull Coll Agric Tokyo Imp Univ* 7: 503-512.
- Topel A, (2004).** *Chemie und Physik der Milch. Naturstoff - Rohstoff–Lebensmittel.* Behr’s Verlag., 758 pp.
- Uniacke-Lowe, T., (2011).** Studies on equine milk and comparative studies on equine and bovine milk systems. PhD thesis. Cork: University College Cork.
- Upadhyay, L.S.B., Verma, N.,(2015).** A three step approach for the purification of alkaline phosphatase from non-pasteurized milk. *J Food Sci Technol* 52, 3140–3146.
- Vamvakaki, A. N., Zoidou, E., Moatsou, G., Bokari, M., & Anifantakis, E. (2006).** Residual alkaline phosphatase activity after heat treatment of ovine and caprine milk. *Small Ruminant Research*, 65, 237-241.
- VanBever AK (1943).** The influence of temperature and pasteurizing time upon the enzymes and bacteria in milk. *Enzymologia* 11: 7-18.
- Vega-Warner AV, Wang CH, Smith DM, Ustunol Z (1999).** Milk alkaline phosphatase purification and production of poly-clonal antibodies. *J FoodSci* 64(4):601-605.
- Vega-Warner, A. V., Gandhi, H., Smith, D. M., & Ustunol, Z. (2000).** Polyclonal-antibody-based ELISA to detect milk alkaline phosphatase. *Journal of agricultural and food chemistry*, 48(6), 2087-2091.
- Wernery, U., Maier, U., Johnson, B., George, R. M., & Braun, F. (2006).** Comparative study on different enzymes evaluating heat treatment of dromedary milk. *Milchwissenschaft*, 61(3), 281-285.
- Wernery U, Fischbach S, Johnson B, Jose S,(2008).** Evaluation of Alkaline phosphatase(ALP), γ -Glutamyltransferase(GGT) and Lactoperoxidase(LPO) activities for their suitability as markers of camel milk heat inactivation. *Milchwissenschaft* 63(3): 265-267.
- Wilińska, A., Bryjak, J., Illeová, V., & Polakovič, M. (2007).** Kinetics of thermal inactivation of alkaline phosphatase in bovine and caprine milk and buffer. *International Dairy Journal*, 17(6), 579-586.
- Williams D.J., (1986).** A modification to the Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test suitable for goat’s milk. *Aust J Dairy Technol.* 41:28-30.

Williams DJ, Nottingham SM., (1990). Suitability of a modification to the Aschaffenburg and Mullen alkaline phosphatase test on goat' s milk: Collaborative study. *Aust J Dairy Technol.* 45(1):21-23.

Wright, R. C., & Tramer, J.,(1953). 510. Reactivation of milk phosphatase following heat treatment. *International Journal of Dairy Research,* 20(2), 177-188.

Ying C, Wang H-T and Hsu J-T, (2002).Relationship of somatic cell count, physical, chemical and enzymatic properties to the bacterial standard plate count in dairy goat milk. *Livestock Production Science,* 74, 63–77.

Yoshitomi, K. (2004). Alkaline phosphatase activity in cheeses measured by fluorometry. *International journal of food science & technology,* 39(3), 349-353.